

UNITED STATES PATENT & TRADEMARK OFFICE

Examiner: Unknown Art Unit: Unknown
Applicant: LEE, Jin Hwa, et al.
Serial No.: To be assigned
Filed Herewith
For: **USE OF CYCLOPHILIN AS ANTIOXIDANT AND
PREVENTION OF CYCLOSPORIN A-INDUCED
TOXICITY IN CELL TRANSPLANTATION BY
OVEREXPRESSION OF CYCLOPHILIN**

LETTER RE PRIORITY

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

August 6, 2003

Sir:

Applicants hereby claim priority of Korean Patent Application No. 10-2002-0069822 filed November 11, 2002. A certified copy is attached hereto.

Respectfully submitted,


MUSERLIAN, LUCAS & MERCANTI, LLP

Michael N. Mercanti
Registration No. 33,966

MUSERLIAN, LUCAS & MERCANTI, LLP
600 Third Avenue
New York, NY 10016
Phone: 212-661-8000
Fax: 212-661-8002

"Express Mail" mailing label no. EV 327 588 067 US
Date of Deposit: August 6, 2003
I hereby certify that this correspondence and/or fee
is being deposited with the United States Postal Service
"Express Mail Post Office to Addressee" service under 37
CFR 1.10 on the date indicated above, in an envelope
addressed to: "Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450".

MUSERLIAN, LUCAS & MERCANTI, LLP.

By: 
Michael N. Mercanti

대한민국 특허청
KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

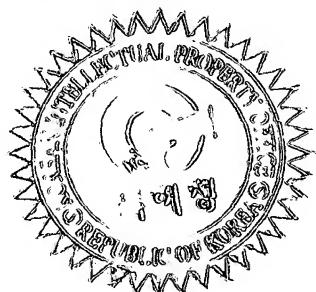
This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2002-0069822
Application Number

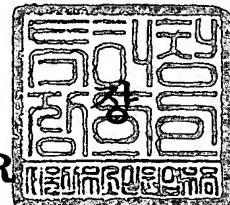
출원년월일 : 2002년 11월 11일
Date of Application NOV 11, 2002

출원인 : 김성수
Applicant(s) KIM, SUNG-SOO

2003 년 07 월 18 일



특허청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.11.11
【발명의 명칭】	사이클로필린의 항산화제로서의 용도 및 사이클로필린의 과발현에 의해 세포이식에서 사이클로스포린 A에 의해 유발되는 세포독성의 방지
【발명의 영문명칭】	Use of Cyclophilin As Antioxidant and Prevention of Cyclosporin A-induced Toxicity in Cell Transplantation by Overexpression of Cyclophilin
【출원인】	
【성명】	김성수
【출원인코드】	4-1999-028175-9
【대리인】	
【성명】	손민
【대리인코드】	9-1999-000420-6
【포괄위임등록번호】	2002-082370-5
【대리인】	
【성명】	이세진
【대리인코드】	9-2000-000320-8
【포괄위임등록번호】	2002-082371-2
【대리인】	
【성명】	김성남
【대리인코드】	9-1998-000150-9
【포괄위임등록번호】	2002-082369-2
【발명자】	
【성명】	김성수
【출원인코드】	4-1999-028175-9
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이진화
【성명의 영문표기】	LEE, Jin Hwa
【주민등록번호】	620102-2106312

【우편번호】	608-090		
【주소】	부산광역시 남구 용호동 LG MetroCity Apt. 131-502		
【국적】	KR		
【발명자】			
【성명의 국문표기】	홍봉		
【성명의 영문표기】	HONG, Feng		
【주소】	서울 동대문구 이문2동 408-4		
【국적】	CN		
【발명자】			
【성명의 국문표기】	하주현		
【성명의 영문표기】	HA, Joo Hun		
【주민등록번호】	630827-1690215		
【우편번호】	140-727		
【주소】	서울특별시 용산구 동부이촌동 강촌아파트 105-502		
【국적】	KR		
【공지예외적용대상증명서류의 내용】			
【공개형태】	간행물 발표		
【공개일자】	2002.08.07		
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대 리인 손		
	민 (인) 대리인		
	이세진 (인) 대리인		
	김성남 (인)		
【수수료】			
【기본출원료】	20	면	29,000 원
【가산출원료】	56	면	56,000 원
【우선권주장료】	0	건	0 원
【심사청구료】	0	항	0 원
【합계】	85,000 원		
【감면사유】	개인 (70%감면)		
【감면후 수수료】	25,500 원		
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통		

【요약서】**【요약】**

본 발명은 PPIase 활성을 갖는 사이클로필린 단백질을 포함함을 특징으로 하는 항산화제에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이식 세포에서 면역억제제 사이클로스포린 A 또는 이의 유사체에 의해 발생되는 독성을 감소시키기에 유효한 양의 PPIase 활성을 갖는 사이클로필린 단백질을 발현하는 재조합 발현 벡터를 포함함을 특징으로 하여, 이식 세포에서 상기 사이클로필린 단백질의 과발현을 유도하여 사이클로스포린 A 또는 이의 유사체에 의해 발생되는 독성을 방지하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 PPIase 활성을 갖는 사이클로필린 단백질의 과발현이 유도되어 사이클로스포린 A 또는 이의 유사체에 대해 내성을 갖는 이식 세포 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

【대표도】

도 9b

【색인어】

세포이식, 사이클로스포린 A, 세포독성, 근육분화, 사이클로필린 단백질의 과발현, 항산화제, PPIase 활성

【명세서】**【발명의 명칭】**

사이클로필린의 항산화제로서의 용도 및 사이클로필린의 과발현에 의해 세포이식에서 사이클로스포린 A에 의해 유발되는 세포독성의 방지{Use of Cyclophilin As Antioxidant and Prevention of Cyclosporin A-induced Toxicity in Cell Transplantation by Overexpression of Cyclophilin}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 사이클로스포린 A(CsA), FK506 및 아스코마이신(ascomycin)이 칼시뉴린 인산 활성에 미치는 효과를 나타내는 그래프이다.

도 2a는 CsA, SDZ NIM811, FK506 및 아스코마이신이 줘의 심장 근모세포의 분화에 미치는 효과를 확인하기 위하여, 상기 약물을 처리한 근모세포의 형태학적 변화를 관찰한 사진이다.

도 2b는 CsA, SDZ NIM811, FK506 및 아스코마이신이 줘의 심장 근모세포의 분화에 미치는 효과를 확인하기 위하여, 상기 약물을 처리한 근모세포의 웨스턴 블롯 분석결과이다.

도 2c는 CsA, SDZ NIM811, FK506 및 아스코마이신이 줘의 심장 근모세포의 세포소멸에 미치는 효과를 확인하기 위하여, 상기 약물을 처리한 근모세포의 터넬(TUNEL)터널 분석결과이다.

도 2d는 CsA, SDZ NIM811, FK506 및 아스코마이신이 쥐의 심장 근모세포의 세포소멸에 미치는 효과를 확인하기 위하여, 상기 약물을 처리한 근모세포의 DNA 분절 분석결과이다.

도 3a는 CsA, SDZ NIM811, FK506 및 아스코마이신이 쥐의 사지 골격근 유래 근모세포의 분화에 미치는 효과를 확인하기 위하여, 상기 약물을 처리한 근모세포의 형태학적 변화를 관찰한 사진이다.

도 3b는 CsA, SDZ NIM811, FK506 및 아스코마이신이 쥐의 사지 골격근 유래 근모세포의 분화에 미치는 효과를 확인하기 위하여, 상기 약물을 처리한 근모세포의 웨스턴 블로트 분석결과이다.

도 3c는 CsA, SDZ NIM811, FK506 및 아스코마이신이 쥐의 사지 골격근 유래 근모세포의 세포소멸에 미치는 효과를 확인하기 위하여, 상기 약물을 처리한 근모세포의 투넬(TUNEL) 분석결과이다.

도 3d는 CsA, SDZ NIM811, FK506 및 아스코마이신이 쥐의 사지 골격근 유래 근모세포의 세포소멸에 미치는 효과를 확인하기 위하여, 상기 약물을 처리한 근모세포의 DNA 분절 분석결과이다.

<도면 부호에 대한 설명>

a: 대조군 b: $1 \mu M$ 의 CsA로 처리

c: $2.5 \mu M$ 의 CsA로 처리 d: $5 \mu M$ 의 CsA로 처리

e: $10 \mu M$ 의 CsA로 처리 f: $1 \mu M$ 의 SDZ NIM811로 처리

g: 1 μ M의 SDZ NIM811로 처리 h: 9 μ M의 SDZ FK506으로 처리

i: 200nM의 아스코마이신으로 처리

도 4는 근육분화 단계동안 CsA가 근육분화 및 세포소멸에 미치는 영향을 확인하기 위하여, CsA로 처리한 세포의 근육분화 단계동안의 형태학적 변화를 관찰한 사진이다.

도 5a는 근육분화 단계동안 CsA에 의해 유발된 독성에 ROS가 관여하는지를 확인하기 위하여, CsA로 처리한 세포의 근육분화 단계동안의 ROS양을 측정한 그래프이다.

<도면 부호에 대한 설명>

a: PM(증식배지)에서 배양한 근모세포의 ROS양

b: DM(분화배지)에서 배양한 근모세포의 ROS양

c: CsA를 처리한 DM에서 배양한 근모세포의 ROS양

d: SDZ NIM811을 처리한 DM에서 배양한 근모세포의 ROS양

e: CsA와 DFOM(deferoxamine mesylate)을 함께 처리한 DM에서 배양한 근모세포의 ROS양

f: CsA와 카탈라제를 함께 처리한 DM에서 배양한 근모세포의 ROS양

도 5b는 항산화제가 CsA에 의해 유도된 세포소멸로부터 세포를 보호할 수 있다는 것을 보여주는 사진 및 세포 생존율에 대한 그래프이다.

<도면 부호에 대한 설명>

Control: 10 μ M의 CsA를 처리한 세포

DFOM: 0.4mM의 DFOM와 10 μ M의 CsA를 처리한 세포

Catalase: 2000unit/ml의 카탈라제와 10 μ M의 CsA로 처리한 세포

도 6a는 세포소멸 단백질인 Bax의 발현에 미치는 CsA의 영향을 확인하기 위하여 웨스턴 블롯 분석한 결과 및 그 결과를 정량화한 그래프이다.

도 6b는 미토콘드리아 막 전위에 미치는 CsA의 영향을 측정한 그래프이다.

<도면 부호에 대한 설명>

a: PM에서 배양한 세포 b: DM에서 배양한 세포

c: 9 μ M의 FK506을 함유한 DM에서 배양한 세포

d: 200nM의 아스코마이신을 함유한 DM에서 배양한 세포

e: 1 μ M의 CsA를 함유한 DM에서 배양한 세포

f: 2.5 μ M의 CsA를 함유한 DM에서 배양한 세포

g: 5 μ M의 CsA를 함유한 DM에서 배양한 세포

h: 10 μ M의 CsA를 함유한 DM에서 배양한 세포

도 7a는 유전자 전달 감염 세포들에서 CypA의 발현수준을 확인하기 위하여 웨스턴 블롯을 분석한 결과 및 그 결과를 정량화한 그래프이다.

도 7b는 유전자 전달 감염 세포들의 배가 시간을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 7c는 유전자 전달 감염 세포들을 CsA를 함유하는 배지 및 함유하지 않는 배지에 서 배양한 후, ROS의 함량을 측정한 결과이다.

도 7d는 유전자 전달 감염 세포들을 CsA 및 H₂O₂에 노출시킨 후의 세포의 형태학적 변화를 나타낸 사진이다.

도 7e는 유전자 전달 감염 세포들을 CsA 및 H₂O₂에 노출시킨 후의 세포의 생존율을 나타낸 그래프이다.

도 7f는 유전자 전달 감염 세포들을 CsA 및 H₂O₂에 노출시킨 후의 Bax의 발현량을 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다.

도 8a는 유전자 전달 감염 세포들의 근육분화가 완료되었을 때의 형태적 변화를 관찰한 사진이다.

도 8b는 항산화제가 근육분화에 미치는 영향을 관찰한 사진이다.

도 9a는 CsA가 CypA 발현을 유도하는지를 확인하기 위하여 CsA로 처리한 세포의 웨스턴 블롯 분석결과이다.

도 9b는 CsA에 사전 노출시킨 세포 및 CsA에 사전 노출시켜 세포증식 및 분화를 억제한 후 다시 CsA에 재노출시켰을 때 세포의 세포증식 및 분화가 가역적인지를 확인하기 위해 형태학적 변화를 관찰한 사진이다.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

<50> 본 발명은 PPIase 활성을 갖는 사이클로필린(Cyclophilin) 단백질의 항산화제로서의 용도 및 세포 이식(cell transplantation)에서 면역억제제 사이클로스포린 A(cyclosporin A, CsA)에 의해 유발되는 독성의 사이클로필린 단백질의 과발현(overexpression)에 의한 방지에 관한 것이다.

<51> CsA는 강력한 면역억제제로서 기관이식 및 자가면역질환에서 널리 사용되고 있다 (Alejandro, D. S., et al., J. Am. Soc. Nephrol. 5, 153-160, 1994). CsA는 높은 친화력으로 CypA와 결합하는 사이클릭 운데카펩타이드(cyclic undecapeptide)이다. CypA는 CsA와의 결합으로 억제되는 PPIase(펩티딜-프로필-시스-트랜스 이소머라제) 활성을 갖는 세포질 단백질이다. PPIase 효소는 단백질 보호물질로서 작용하는데 단백질의 폴딩(folding), 세포내 이동을 촉진하고 다단백 복합체의 안정성을 유지해주는 역할을 한다(Andreeva, L., et al., Int. J. Exp. Pathol. 80, 305-315, 1999; 및 Hamilton, G. S., et al., J. Med. Chem. 41, 5119-5143, 1998). 하지만 이런 PPIase 활성의 억제가 면역억제 작용에 꼭 필요한 것은 아니다(Bierer, B. E., et al., Science 250, 556-559, 1990). CypA 단독과는 달리 CsA-CypA 복합체는 칼슘 및 칼모듈린(calmodulin) 의존성 단백 인산효소인 칼시뉴린(calcineurin)과 결합하여 그 활성을 억제시킨다(Friedman, J., et al., Cell 66, 799-806, 1991; 및 Liu, J., et al., Biochemistry 31, 3896-3901, 1992). 칼시뉴린 활성의 억제는 활성화된 T 세포의 핵인자요소(nuclear factors of activated T cells, NFATs)의 전좌(translocation)를 차단하여 T-헬퍼

(helper) 세포로 하여금 면역작용의 활성화를 매개하는 수종의 림포킨(lymphokines)을 발현하지 못하도록 한다(Matsuda, S., et al., *Immunopharmacology* 47, 119-125, 2000).

<52> CsA는 이식 및 자가면역 질환 치료에 획기적인 전기를 가져온 약물이지만 골격근육을 포함한 다양한 조직에 독성을 유발하여 환자에게 중대한 장애를 일으킨다 (Rush, D. N., *Clin. Biochem.* 24, 101-105, 1990; Arellano, F., et al., *Lancet* 337, 915, 1991; 및 Biring, M. S., et al., *J. Appl. Physiol.* 84, 1967-1975, 1998). CsA에 의해 유발된 근육병은 임상적으로 근육통, 경련, 근육 약화, 혈장 크레아틴ки나제(creatine kinase)의 상승을 일으킨다(Goy, J. J., et al., *Lancet* 1, 1446-1447, 1989; 및 Fernandex-Sola, J., et al., *Lancet* 335, 362-363, 1990). CsA-유도 근육병의 기전을 규명하고자 하는 시도가 많이 있어 왔다. 여러 연구에서 CsA가 재생된 근섬유에서 근육결핍을 유발하고 근모세포 배양에서 근육 분화를 억제하여 위성 근모세포로부터의 근육재생을 방해한다고 제안되었다(Hardiman, O., et al., *Neurology* 43, 1432-1434, 1993; Abbott, K. L., et al., *Mol. Biol. Cell* 9, 2905-2916, 1998; 및 Friday, B. B., et al., *J. Cell Biol.* 149, 657-666, 2000). 또 다른 연구들에서는 CsA가 마이토콘드리아의 호흡 (mitochondrial respiration)을 감소시키고(Hokanson, J. F., et al., *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 151, 1848-1851, 1995) 크레아틴 전달체 감소에 의한 크레아틴 섭취 감소를 유발한다는(Tran, T. T., et al., *J. Biol. Chem.* 275, 35708-35714, 2000) 사실을 밝혀 CsA-유도 근육병이 마이토콘드리아 장애 또는 변경된 에너지 상태와 관련이 있음을 시사하였다.

<53> 근모세포 또는 위성세포는 근원성 줄기세포(myogenic stem cells)로서 종식 및 융합을 통하여 손상된 근섬유를 치유 또는 대체하는 능력을 가지고 있다. 1980년대 말에

유전성 근육병의 dy/dy 및 mdx 마우스 모델을 이용하여 이영양성 근육(dystrophic muscles)에 정상 유전자를 삽입할 수 있음이 알려졌고(Law, P. K. et al., *Muscle Nerve* 11, 525-533, 1998; 및 Partridge, T. A. et al., *Nature* 337, 176-179, 1989), 이를 기반으로 하여 1990년대 초반에 심한 유전성 근육병의 전형이라고 할 수 있는 듀센(Duchenne) 근이영양증 환자에서 동종 근모세포의 이식(allogenic myoblast transplantation, AMT)을 시도하게 되었다. 불행히도 초기의 임상적 시도는 성공적이지 못했으며(Skuk, D. et al., *Microsc. Res. Tech.* 48, 213-222, 2000), 이후 여러 연구 그룹들이 동물 모델을 이용하여 이식된 근모세포의 생존율 향상을 위한 연구를 시작하였고, 이를 통하여 이식된 근모세포는 일차적으로 면역반응에 의해 거부되므로(Gill, R. G. et. al., *Cell Transplant* 4, 361-370, 1995), AMT를 성공하기 위해서는 적당한 면역 억제제를 선정하고, 선정된 면역억제제를 근모세포를 이식하기 전에 투여하여야 한다는 사실이 알려졌다.

<54> 동종 근모세포 이식에서 사용될 수 있는 것으로 알려진 면역억제제로는 사이클로스포린 A(cyclosporin A, CsA), 타크로리무스(tacrolimus, FK506), 시클로포스파마이드(cyclophosphamide) 등이 있으며, 이중 FK506은 임상 시도 및 동물 실험에서 95% 이상의 높은 성공율을 보인 반면(Kinoshita, I. et al., *Muscle Nerve* 17, 1407-1415, 1994; Kinoshita, I. et al., *Muscle Nerve* 18, 1217-1218, 1995), 시클로포스파마이드는 AMT 후에 융합된 근섬유의 생존을 증가시키지 못하여(Karpati, G. et al., *Ann. Neurol.* 34, 8-17, 1993; 및 Vilquin, J. T. et al., *Neuromuscul. Disord.* 5, 511-517, 1995), CsA는 중등도의 성공율을 보이는 것으로 알려졌다(Labrecque, C. et al.,

Transplant. Proc. 24, 2889-92, 1992). 특히, CsA는 강력한 면역억제제로서 이식 치료에서 획기적인 전기를 가져온 약물이지만, ROS에 의해 여러 세포에서 세포독성이 유발되며(Wang, C. et al., *Transplantation* 58, 940-946, 1994; Perez de Lema, G. et al., 62, 1745-1753, 1998; 및 Wolf, A. et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280, 1328-1334, 1997), 재생된 근섬유에서는 근육 결핍을 유발시키고, 근모세포 배양에서 근육 분화를 억제하여 위성 근모세포로부터의 근육재생을 방해(Hardiman, O. et al., 43, 1432-1434, 1993; Abbott, K. L. et al., *Mol. Biol. Cell.* 9, 2905-2916, 1998; 및 Friday, B. B. et al., *J. Cell. Biol.* 149, 657-666, 2000)하기 때문에 성공률이 낮은 것으로 알려져 있다.

<55> 이식 성공률을 높이기 위해서 CsA에 의해 유발된 세포의 독성을 제거하고자 하는 노력이 있어 왔고, 예를 들면, 그를 위해 CsA와 함께 항산화제를 사용한 사례들이 있다 (Wang, C. et al., *Transplantation* 58, 940-946, 1994; Perez de Lema, G. et al., *Life Sci.* 62, 1745-1753, 1998; Kumar, K. V. et al., *Transplantation* 67, 1065-1068, 1999; 및 Naidu, M. U. et al., *Nephron.* 81, 60-66, 1999). 그러나, 항산화제는 세포 내의 ROS 증가로 인한 세포소멸(apoptosis)로부터 세포를 부분적으로 보호할 수는 있지만, 세포의 분화가 차단되는 것을 방지할 수는 없었다.

<56> 이에, 세포 이식에서 면역억제제 CsA에 의해 유발되는 세포의 독성을 더욱 효과적으로 완화시킴으로써 세포 이식의 성공률을 향상시킬 수 있는 개선된 방안이 요구되고 있다. 본 발명의 목적은 이러한 요구를 충족할 수 있는 방안을 개발하는데 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<57> 본 발명자들은 이식 세포에 미치는 사이클로스포린 A(CsA)의 독성, 즉 이식 세포의 세포소멸(apoptosis) 및 세포분화 차단이 산화 스트레스에 의해 부분적으로 사이클로필린 A(CypA)의 PPIase 활성이 억제됨으로써 발생함을 발견하였다. 이러한 발견은 CypA의 PPIase 활성이 세포분화에 직접적으로 관여하고 있음을 밝히는 것인 한편, CsA에 의해 유발된 세포분화의 차단이 칼시뉴린(calcineurin) 활성의 억제에 의한 것이라는 종래의 사실과 상반되는 것이다. 또한, 본 발명자들은 이식 세포를 CsA에 사전 노출시킨 후 생존한 세포가 가역적으로 증식 및 분화할 수 있을 뿐만 아니라 추가적인 CsA 노출에도 내성을 가짐을 발견하였다. 이러한 발견을 기초로 하여 본 발명자들은 이식 세포에 CypA의 과발현을 유도함으로써 이식 세포에 대한 CsA의 독성이 현저히 완화됨을 확인하였다.

<58> 한 가지 관점으로서, 본 발명은 PPIase 활성을 갖는 사이클로필린 단백질을 포함함을 특징으로 하는 항산화제를 제공한다.

<59> 다른 관점으로서, 본 발명은 이식 세포에서 면역억제제 사이클로스포린 A 또는 이의 유사체에 의해 발생되는 독성을 감소시키기에 유효한 양의 사이클로필린 단백질을 발현하는 재조합 발현 벡터를 포함함을 특징으로 하여, 이식 세포에서 사이클로필린 단백질의 과발현을 유도하여 사이클로스포린 A 또는 이의 유사체에 의해 발생되는 독성을 방지하는 약제학적 조성물을 제공한다.

<60> 또 다른 관점으로서, 본 발명은 사이클로필린 단백질의 과발현이 유도되어 사이클로스포린 A 또는 이의 유사체에 대해 내성을 갖는 이식 세포를 제공한다.

<61> 또 다른 관점으로서, 본 발명은 사이클로필린 단백질을 코딩하는 유전자를 작동적으로 연결되도록 벡터에 도입하여 재조합 발현 벡터를 제조하고, 재조합 발현 벡터를 이식 세포에 감염시켜 배양하고, 배양물로부터 사이클로필린 단백질이 과발현된 세포를 분리함을 포함함을 특징으로 하여, 사이클로스포린 A 또는 이의 유사체에 대해 내성을 갖는 이식 세포를 제조하는 방법을 제공한다.

<62> 또 다른 관점으로서, 본 발명은 이식 세포를 사이클로스포린 A 또는 이의 유사체로 처리하여 배양하고, 배양물로부터 생존 세포를 회수함을 특징으로 하여, 사이클로스포린 A 또는 이의 유사체에 대해 내성을 갖는 이식 세포를 제조하는 방법을 제공한다.

【발명의 구성 및 작용】

<63> 사이클로스포린 A(CsA)는 사이클로필린 D(CypD)라는 마이토콘드리아 단백질에 결합한 후 마이토콘드리아 막투과 전이공 (mitochondrial membrane permeability transition pore, MPTP)을 차단함으로써 항세포소멸 효과를 가지는 것으로 알려져 있다(Szabo, I., et al., J. Biol. Chem. 266, 3376-3379, 1991; 및 Halestrap, A.P., et al., Biochem. J. 268, 153-160). 반면에 몇몇 증거들은 CsA가 산화 스트레스를 유발한다는 것을 보여주고 있다(Longoni, B., et al., FASEB. J. 15, 731-740, 2001; Leonardi, A., et al., Arch. Ophthalmol. 119, 1512-1517, 2001; Zhong, Z., et al., Am. J. Physiol. 275, F595-604; 및 Zhong, Z., et al., Mol. Pharmacol. 56, 455-463). 또한 몇몇 보고에서는 항산화제에 의해 CsA 독성이 감소되므로 반응성 산소 종(reactive oxygen species, ROS)이 CsA 독성의 중요한 요인이라고 제시하고 있다(Wang, C., et al.,

Transplantation 58, 940-946, 1994; Kumar, K. V., et al., Transplantation 67, 1065-1068, 1999; 및 Naidu, M. U., et al., Nephron. 81, 60-66, 1999).

<64> 이러한 공지의 연구 결과들과 마찬가지로, 본 발명자들 또한 실험을 통하여 CsA가 근육분화 초기에 ROS 생성을 통하여 분화차단 및 세포소멸을 일으킴을 확인하였다. ROS 수준으로 측정한 스트레스 정도는 CsA 농도에 비례하였다. CsA는 1 내지 $10 \mu\text{M}$ 사이의 범위에서 농도에 비례하여 더 많은 세포가 세포소멸을 보였고 근육분화는 $2.5 \mu\text{M}$ 에서 완전히 차단되었다. 항산화제 처치는 세포소멸은 방지하였으나 분화차단을 막지는 못하였다. CsA 처치에 따라 Bax 발현은 증가하였고 마이토콘드리아 막전위는 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 CsA-유도-세포소멸에 마이토콘드리아 손상이 연관되어 있을 수도 있음을 시사한다. 이런 명백히 모순되는 CsA의 효과는 용량에 따라 달라지는 CsA의 작용으로 설명할 수 있다. ROS 수준이 거의 독성이 없는 nM (nanomole)의 농도 범위에서 CsA의 항세포소멸 작용이 보고되고 있다. 반면에 $1 \mu\text{M}$ 이상의 ROS 농도에서는 산화 스트레스를 유발하고 CsA에 반응하지 않는 조절되지 않는 방식으로 MPTP를 개방한다 (He, L., et al., FEBS Lett. 512, 1-7). CsA가 어떻게 Bax 발현, 마이토콘드리아 막전위 또는 카스파제 3 발현을 변화시키고 세포소멸을 일으키는지에 대한 자세한 기전은 밝혀져 있지 않다.

<65> ROS가 CsA 독성을 매개한다는 것을 알고 있음에도 불구하고 CsA가 ROS를 생성하는 분자기전은 잘 규명되어 있지 않았다. CsA의 세포내 표적인 사이클로필린 A(CypA)는 항-ROS-기능을 가지는 것으로 제시되어 왔다 (Doyle, V., et al., Biochem. J. 341, 127-132, 1999; 및 Lee, J. P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 3251-3256). 본 발명자들의 실험 결과에 의하면 CsA-매개 ROS 생성은 CypA/WT 세포(H9c2

쥐의 심장 근모세포에 야생형 쥐 뇌의 CypA 유전자가 형질감염된 세포)에서 감소되었고 CypA/R55A 세포(H9c2 쥐의 심장 근모세포에 쥐 뇌의 CypA 변이 유전자가 형질감염된 세포로서, 그 변이 유전자는 CypA 단백질의 55번 위치 아미노산 잔기가 아르기닌으로부터 알라닌으로 치환된 CypA 변이 단백질을 발현하며 이 변이 단백질은 야생형에 비하여 1/1000로 감소한 웨티딜-프롤릴-시스-트랜스 이소머라제(PPIase) 활성을 갖는다)는 모조-유전자전달감염세포보다 더 많은 산화 스트레스를 겪었다. 이러한 본 발명의 데이터는 PPIase 활성이 CypA의 항-ROS-기능과 밀접한 연관성을 가지고 있으며 결과적으로 CsA는 최소한 부분적으로 PPIase활성을 억제시킴으로써 ROS를 생성함을 시사한다. CypA의 산화환원반응에 민감한 SH그룹에 의한 항산화 활성(Lee, S. P., et al., J. Biol. Chem. 276, 29826-29832)에는 CypA/R55A가 ROS 청소제거기능은 상실했지만 온전한 SH그룹은 유지하고 있기 때문에 PPIase활성을 필요로 할 수 있다.

<66> 본 발명에 따르면 우성적인 음성 CypA/R55A의 과발현이 CsA 처치와 무관하게 근육분화를 완전하게 차단하기 때문에 PPIase 활성이 근육분화에서 직접적인 역할을 하고 있는 것으로 보인다. 실제로 분화중인 근모세포는 상당량의 ROS를 생성하며 CypA/R55A의 과발현은 분화배지(DM)에서 ROS 수준을 증강시키므로 CypA/R55A가 ROS를 독성 수준까지 생성하여 근육분화를 차단할 수도 있음을 추정할 수 있다. 그러나 본 발명에 이르러, 근육분화 과정 중에 항산화작용과는 무관한 PPIase활성의 직접적인 관여가 있음을 다음과 같은 사실로 밝혀졌다. 우선 DM에서 CypA/R55A 세포의 ROS 수준이 근육분화가 부분적으로만 방해받고 있는 DM에서 1 mM CsA로 처치한 모조-유전자전달감염 근모세포에 필적할 정도였다. 또한, CypA/WT, CypA/W121F (H9c2 쥐의 심장 근모세포에 쥐 뇌의 CypA 변이 유전자가 형질감염된 세포로서, 그 변이 유전자는 CypA 단백질의 121번 위치 아미노산

잔기가 트립토판으로부터 페닐알라닌으로 치환된 CypA 변이 단백질을 발현하며 이 변이 단백질은 야생형에 비하여 CsA-결합 친화력이 1/100으로 감소하고 절반 정도의 PPIase 활성을 갖는다) 및 항산화제는 ROS를 줄임으로써 CsA-유도-세포소멸로부터 세포를 보호 하지만 분화차단을 역전시키지는 못하였다. 근육분화에는 DM에서 생리적인 ROS 생성이 요구되기 때문에, 이 경우에는 CypA/WT, CypA/W121F 또는 항산화제에 의해 ROS 수준을 근육분화에 필요한 농도 이하로 낮춘 것이 중요한 요인이 될 수 있다. 하지만 다양한 농도의 항산화제로 처치하여 ROS를 적정화했지만 CsA에 의한 분화차단은 사라지지 않았다. 반면에 다른 산화제인 메나디온(menadione) 또는 독소루비신(doxorubicin)에 의해 야기된 분화차단은 ROS 적정화로 역전될 수 있었다. ROS 수준을 생리적인 농도까지 낮추어도 CsA 독성에 의한 분화차단 효과를 반전시키지 못한 것은 CsA에 의해 CypA-PPIase 활성이 억제되기 때문임을 시사한다. CypA-PPIase 활성은 문자구조-보조제 역할을 하기 때문에(Andreeva, L., et al., Int. J. Exp. Pathol. 80, 305-315), CsA가 근생성 단백질의 적절한 폴딩(folding)을 방해함으로써 근육분화를 차단할 수 있음을 가정해 볼 수 있다. 이와 같은 직접적이고 간접적인 CypA-PPIase 활성의 필요성은 CypA-PPIase 활성의 차단이 CsA-매개-분화차단의 주된 기전임을 나타낸다. 이러한 본 발명의 발견은 CsA가 칼시뉴린(calcineurin) 활성을 억제함으로써 근육분화를 차단한다는 이전의 연구 결과(Friday, B. B., et al., J. Cell. Biol. 149, 657-666)를 분명하게 반박하는 것이다. 본 발명에서는 칼시뉴린 억제 작용이 없는 CsA 유도체인 SDZ NIM811이 동일한 독성을 보이며, FK506 및 아스코마이신(ascomycin)이 근육분화과정에서 일시적으로 증가된 칼시뉴린 활성을 완전히 억제하는 농도에서도 분화차단을 일으키지 않음을 보여주고 있다. 위 결과는 일시적인 칼시뉴린 활성이 근육분화에 필수적인 요소가 아님을 나타낸다.

<67> 산화 스트레스에 의한 CypA의 유도가 근래 들어 보고되고 있다(Hovland, A. R., et al., *Neurochem, Int.* 35, 229-235). 본 발명자들의 실험 결과에 의하면 CsA에 의한 CypA 유도는 $5\text{ }\mu\text{M}$ 농도에서 최고조에 달하는데, 이 농도에서는 완전한 분화차단 및 절반 정도의 세포소멸이 야기된다. CsA에 사전노출된 근모세포는 각각 증식배지(PM) 및 DM에 다시 넣었을 때 더 높은 농도에서도 가역적으로 증식 및 분화할 수 있었다. 뿐만 아니라, 근모세포들은 CsA 재노출에 대해 내성을 보였다. 이러한 본 발명의 결과는 CypA 단백질 발현의 유도가 CsA에 의한 적응반응에서 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다. 저농도의 CsA에 노출된 후의 적응반응에서 CypA가 유도됨으로써 더 높은 농도에서도 분화가 가능하게 되었다. 반면에 CypA/wt 및 CypA/W121F 세포에서는 $10\text{ }\mu\text{M}$ CsA 존재 하에서 세포소멸로부터 보호되기는 했지만 분화는 불가능하였다. 이와 같은 CsA에 대한 적응반응이 생체에서도 매우 중요하리라 생각되는데, 정상적인 혈액 내 CsA 농도는 $0.1 \sim 0.6\text{ }\mu\text{M}$ 범위에 있지만 투약 직후나 이식 후의 좀 더 높은 초기 용량에 의해 혈액농도가 변동하는 과정에서 일시적으로 $1\text{ }\mu\text{M}$ 또는 그 이상의 농도(세포소멸이 가능한)에 이를 수도 있다(Shaw, L. M., et al., *Clin. Chem.* 36, 1841-1846, 1990; 및 Tegzess, A. M., et al., *Transplant. Proc.* 20(Suppl. 3), 530-533, 1988). 이 경우 이식된 또는 위성 근모세포는 적응반응이 없이는 생존 및 분화가 불가능할 수도 있다. 물론 CsA의 혈액내 농도에 대한 근모세포의 생체내 민감도에 다소의 차이가 있을 수 있지만, 적응반응을 통해 AMT환자에서 이식된 근모세포의 생존율을 향상시킬 수 있을 것이다.

<68> 본 발명은 CsA 독성이 산화 스트레스에 의해 최소한 부분적으로는 CypA PPIase 활성의 억제를 통해서 발생하며, CypA의 PPIase 활성이 ROS 청소 효과를 제공하고, CypA

과발현은 CsA 독성으로부터 세포를 보호하고, CypA의 PPIase 활성은 근육분화에 직접적으로 관여하고 있다는 발견을 기초로 하고 있다.

<69> 한 가지 관점으로서, 본 발명은 사이클로필린 단백질의 항산화제로서의 용도에 관한 것이다.

<70> 본 발명에서 사이클로필린 단백질의 정의는 PPIase 효소 활성을 갖는 모든 천연, 재조합 사이클로필린 단백질, 이형체(isoforms) 및 변이체(mutants)를 포함한다. 사이클로스포린 A의 결합 수용체 단백질로서 사이클로필린 A(CypA)가 처음으로 피셔 등에 의해 효소 활성을 나타내는 것으로 밝혀졌다(Fischer, et al., *Biomed. Biochim. Acta*, 43:1101-1111, 1984). 피셔 등은 프롤린 함유 펩타이드의 시스-트랜스 상호전환을 촉매 할 수 있는 효소를 돼지 신장에서 처음으로 동정하고 이 효소를 펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 이소머라제(PPIase)라 명명하였다. 이후 그 효소의 N-말단 펩타이드 서열 분석 결과 그 효소는 사이클로필린과 동일한 것으로 드러났다(Lang, et al., *Nature*, 329:268-270, 1987). CypA는 사람, 소, 돼지 등을 포함한 모든 포유동물 조직(Koletsky, et al., *J. Immunol.* 137:1054-1059, 1986)에서 풍부하게 발현되는 18-kDa 세포질 단백질(Haendler, et al., *EMBO. J.*, 6:947-950, 1986)이다. CypA가 밝혀진 이후로 많은 다른 사이클로필린이 동정되었고 이들 모두는 PPIase 활성을 갖는 것으로 나타났으며 27종 이상의 사이클로필린의 서열이 알려져 있다. 사이클로필린의 예로는 소기관 및 막을 표적으로 하여 그에 결합하도록 작용하는 독특한 도메인이 인접한 고도로 보존된 18-kDa 도메인을 갖는 사이클로필린 이형체(isoforms)(Gething, et al., *Nature* 355:33-45, 1992; Price, et al., *PNAS*, 88:1903-1907, 1991; Spik, et al., *J. Biol. Chem.*

266:10735-10738, 1991; Friedman, et al., Cell 66:23204-23214, 1991; 및 Bergsma, et al., J. Biol. Chem. 266:23024-23214, 1991)를 들 수 있다. 이들은 사람으로 유래된 Cyp-40(40 kDa)(Kieffer, et al., J. Biol. Chem. 266:5503-5507, 1992) 및 Cyp-60(60 kDa)(Wang, et al., Biochem. J. 314:313-319, 1996) 단백질 및 표면-결합된 천연 킬러 (NK) 세포 사이클로필린(150 kDa)(Anderson, et al., PNAS, UAS 90:542-546, 1993)을 포함한다. 또 다른 예로는 *Schistosoma mansoni*(상기 Koletsky, et al., J. Immunol; Klinkert, et al., Mol. Biochem. Parasitol., 75:99-111, 1995; 및 Kiang, et al., Mol. Biochem. Parasitol., 76:73-82, 1995), *Toxoplasma gondii*(High, et al., J. Biol. Chem., 269:9105-9112, 1994) 및 *Plasmodium falciparum*(Bell, et al., Biochem. Pharmacol., 48:495-503, 1994; 및 Reddy, et al., Mol. Biochem. Parasitol., 73:111-121, 1995)을 포함한 많은 기생충에서 발견된 사이클로필린이 포함된다.

<71> 본 발명에 따른 사이클로필린 단백질의 정의에 포함되는 아미노산 서열 변이체는 치환, 삽입 또는 결실 변이체중 하나 이상을 포함한다. 이들 변이체는 보통 카세트 돌연 변이유발 또는 기타 본 분야에 잘 알려진 기술을 이용하여 사이클로필린 단백질을 코딩하는 DNA에서 뉴클레오파이드의 부위 지정 돌연변이를 유발하여 변이체를 코딩하는 DNA를 작제한 후 이 DNA를 재조합 세포 배양을 통해 발현시킴으로써 제조된다. 아미노산 서열 변이체는 예정된 변이 성질로 특징지워진다. 변이체는 전형적으로 천연형 유사체와 동일한 정석적 생물학적 활성을 나타낸다. 아미노산 서열의 변이를 도입하는 부위 또는 영역은 예정되어 있는 한편, 변이 자체는 예정될 필요가 없을 수 있다. 예를 들면, 주어진 부위에서 돌연변이의 성능을 최적화

하기 위해, 표적 코돈 또는 영역에서 랜덤 돌연변이유발을 수행하고 발현된 사이클로필린 단백질 변이체를 원하는 활성의 최적 조합에 대해 선별할 수 있다. 서열이 알려진 DNA에서 예정된 부위에 치환 돌연변이를 유도하는 기술은 잘 알려져 있으며 예를 들면 M13 프라이머 돌연변이유발이다. 돌연변이체의 선별은 사이클로필린 단백질의 활성을 검정하여 실시한다. 예를 들면, 본 분야에 잘 알려진 기술(Fischer et al., *Biomed. Biochim. Acta* 43:1101-11, 1984; 및 Harrison et al., *Biochem.* 29:1684-1689, 1990)을 이용하여 이소미라제 활성을 평가할 수 있다. 사이클로스포린 A 또는 다른 면역조절체 와의 결합을 검정할 수 있다. 아미노산 치환은 전형적으로 단일 잔기이며, 삽입은 보통 약 1 내지 20개 아미노산의 연속 서열로 이루어질 수 있으나, 보다 큰 삽입 또한 가능할 수 있다. 결실 범위는 약 1 내지 30개의 잔기이나, 일부 경우에는 도메인중 하나가 결실될 수 있는 것과 같이 보다 큰 결실 또한 가능할 수 있다.

<72> 변이체는 전형적으로 천연형 유사체와 동일한 정석적 생물학적 활성을 나타낸다. 필요에 따라 사이클로필린 단백질의 특징을 변형시킨 변이체가 선택될 수 있다. 다른 경우로서, 사이클로필린 단백질의 생물학적 활성이 변형된 변이체가 고안될 수 있다. 예를 들면, 이소미라제 활성에 연루된 추정 잔기가 변형될 수 있는데, 사이클로스포린 A와 접촉하는 것으로 제시되어 온 사람 사이클로필린 A의 잔기 Lys31, Arg55, Gln63, Glu81, Asn102, Trp121 및 His126 등이 변이될 수 있다.

<73> 사이클로필린 유전자는 당업자에게 알려진 많은 기술을 사용하여 분리할 수 있다. 예를 들면, 유기체로부터 분리한 mRNA로부터 역전사에 의한 통상적인 방법,

예를 들면 PCR 또는 써던 블롯 분석에 의해 cDNA 또는 발현 라이브러리를 생성할 수 있다. 얻은 DNA는 pBR322, pUC19 또는 T 벡터와 같은 벡터내로 아클로닝할 수 있다. 사이클로필린 코딩 DNA 서열이 일단 동정되면 적절한 발현 벡터, 예를 들면 이. 콜라이로부터 유래된 플라스미드(예, pET3A, pBluescript 또는 pUC19), 바실러스 서브틸리스로부터 유래된 플라스미드(예, pUB110, pTB5 또는 pC194), 효모로부터 유래된 플라스미드(pSH19 및 pSH15), 박테리오파아지(예, 람다 파아지), 동물 바이러스(예, 레트로바이러스) 및 곤충 바이러스(예, 백클로바이러스)로 클로닝시킬 수 있다. 재조합 벡터는 형질전환 및 파아지 감염에 대한 표준 기술을 이용하여 적절한 숙주내로 도입한다. 예를 들면, 이. 콜라이의 경우 염화칼슘 방법을 사용한다(S. N. Cohen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110, 1972). 바실러스의 형질전환은 문헌[S. Chang, et al., Molecular and General Genetics, 168:111, 1979]에 공지된 방법에 따라 실시할 수 있다. 효모의 형질전환은 문헌[Parent, et al., Yeast, 1:83-138, 1985]에 공지된 방법에 따라 리튬아세테이트나 스페로플라스트 (spheroplast)법 등을 실시할 수 있다. 동물 세포의 형질전환은 예를 들면 문헌[Virology, 52:456, 1973]에 기술된 방법에 따라 실시할 수 있다. 백클로바이러스에 의한 곤충세포의 형질전환은 문헌[Biotechnology, 6:47, 1988]에 기술된 방법에 따라 실시할 수 있다. 형질전환체는 사용된 숙주 세포에 따라 이러한 세포에 적절한 표준 기술을 이용하여 배양한다. 예를 들면, 이. 콜라이를 배양하는 경우, 세포는 30내지 40°C에서 LB 배지에서 포화정지 단계까지 성장시킨다. 사이클로필린 단백질은 형질전환체의 배양물로부터 예를 들면 배양된 세포 또는 배양 용액으로부터 추출하여 분리 정제할 수 있다. 배양액 또는 세포 추출물에 함유된 사이클로필린 단백질의 분리 및 정제는 많은 공지 방법에 의해 실시할 수 있다. 이들 방법의 예로는 염 침전 및 용매 침전

과 같은 용해성을 이용한 방법, 투석, 한외여과, 겔여과 및 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동과 같은 분자량의 차이를 이용한 방법, 이온-교환 컬럼 크로마토그래피와 같은 전하의 차이를 방법, 역상 고성능 액체 크로마토그래피와 같이 친수성의 차이를 이용한 방법 및 등전점 포커싱 전기영동과 같은 등전점의 차이를 이용한 방법을 들 수 있다.

<74> 본 발명에서 항산화제는 생물학적으로 중요한 ROS 또는 다른 반응성 산소 종(O_2^- , H_2O_2 , HO^- , HOCl, 폐릴, 폐록실, 폐록시니트릴 및 알콕실)을 청소제거하거나 유리 라디칼 또는 다른 반응성 산소 종을 보다 약한 반응성 종으로 촉매적으로 전화변환시키는 작용을 하는 물질을 가리킨다. 본 발명의 사이클로필린 단백질은 세포 배양물 또는 검정 반응에 참가했을 때 상기 ROS 또는 상기 반응성 산소 종을 제거하거나 검출가능한 정도로 감소시키는 항산화 활성을 갖는다.

<75> 산소 분자는 사람을 포함한 비조건 호기성 유기체(nonfacultative aerobic organisms)에게 필수 영양소이다. 산소는 비록 호기성 대사에 필수적이기는 하나 통칭하여 반응성 산소 종(reactive oxygen species, ROS)으로 알려진 과산화물 음이온 및 과산화수소와 같은 독성 대사산물로 전환될 수 있다. 여러 형태의 산소 및 유리 라디칼의 과다한 농도는 막 지질의 과산화, 핵산 염기의 하이드록실화 및 단백질내의 셀프하이드릴 기 및 기타 민감성 잔기들의 산화를 포함하여 생명 체계에

심각한 유해 효과를 나타낼 수 있다. 만일 조절되지 않은 경우에는 돌연변이 및 세포 사멸의 결과를 초래한다. 생물학적 항산화제로는 잘 알려진 천연 금속합유효소 (metalloenzymes), 예를 들면 과산화물 디스뮤타제(superoxide dismutase, SOD), 카탈라제(catalase, CAT) 및 셀레늄 글루타티온 페록시다제뿐만 아니라 인지질 하이드로퍼옥사이드 글루타티온 페록시다제와 같은 효소가 포함된다. 많은 질환 또는 퇴행성 과정들은 산소분자 환원(dioxygen reduction)으로부터 유도된 ROS의 해독에 연루된 금속합유효소의 이상과 관련이 있다. 이들 금속합유효소의 역할은 SOD 또는 CAT의 감소발현 (underexpression)을 나타내는 동물에서 증명되었다. 또한, 아연-결핍 SOD에 의한 운동 신경세포에서의 산화질소-의존 디스뮤타제의 유도가 최근에 제시되었다(Estevez, et al., Science, 286:2498-2500, 2000).

<76> 재조합 금속합유효소를 치료요법에 이용하는데는 많은 장애물이 있다. 예를 들면, 용액 불안정성, 제한된 세포 이용성, 면역원성, 짧은 반감기, 생산비, 유전자독성 (genotoxicity) 및 단백질 가수분해에 의한 소멸이 포함된다. 다른 한편으로, 이들 촉매적 스캐빈저(catalytic scavengers)는 생리 조건에서 안정해야하고, pH 7.0에서 수용성이어야 하며, 유전자에 무독성이어야 한다.

<77> 유리 라디칼 및 옥시던트(oxidant) 종의 효소 촉매적 해독이외에, 글루타티온, 아스코베이트, 토코페롤, 유비퀴논(ubiquinone), 빌리루빈(bilirubin) 및 요산과 같은 저분자량의 여러 항산화제가 천연의 생리학적 항산화제로 작용한다(Krinsky, NI, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 200: 248-54, 1992). 카로테노이드(carotenoids)는 산화 스트레스 및 만성 질환에 대한 보호제로서 연루된 소분

자 항산화제의 다른 부류이다. 문현[Canfield et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 200: 260, 1992]에는 카로티노이드와 여러 만성 질환(예, 관상 심장 질환, 백내장 및 암) 사의 보고된 연관성이 요약되어 있다.

<78> 허혈 조직의 재산소포화산소재충전(reoxygenation) 동안에 옥시라디칼 형성의 손상 효과를 방지하고자 하는 노력으로 여러 항산화제가 사용되어 왔다. 옥시라디칼-유도된 손상을 방지하고자 하는 한 가지 전략은 과산화물과 같은 옥시라디칼의 형성을 억제하는 것이다. 철 이온 칼레이트제, 예를 들면 데스페리옥사민(데페록사민 또는 데스페랄(Desferal)이라고도 한다) 등은 철 이온-의존 HO^\cdot 발생을 억제하며 이에 따라 유리 라디칼 형성의 억제제로서 작용한다(Gutteridge et al., Biochem. J. 184: 469, 1979; Halliwell B., Free Radical Biol. Med. 7, 1989; 및 Van der Kraaij et al., Circulation 80: 158, 1989). 아미노-스테로이드-계열 항산화제, 예컨대 21-아미노스테로이드(일명 라자로이드(lazaroids)라고 한다)(예, U74006F)가 옥시라디칼 형성의 억제제로서 제안되었다. 데스페리옥사민, 알로퓨리놀(allopurinol) 및 기타 피라졸로피리미딘(예, 옥시퓨리놀)이 또한 심근 가역적 상해 모델 시스템(myocardial stunning model system)에서(Bolli et al., Circ. Res. 65: 607, 1989) 및 출혈성 및 내독성 쇼크 후에(DeGarvilla et al., Drug Devel. Res. 25:139, 1992) 옥시라디칼 형성의 방지에 대해 시험되었다. 그러나, 이들 각 화합물은 치료 요법에서 뚜렷한 결함을 나타낸다. 예를 들면, 데페록사민은 이상적인 철 칼레이트제가 아니며 이의 세포내 침투는 아주 한정적이다.

<79> 옥시라디칼-유도된 손상을 방지하는 다른 전략은 과산화물과 같은 옥시라디

칼이 일단 형성되면 이들을 촉매적으로 제거하는 것이다. 과산화물 디스뮤타제 및 카탈라제는 많은 유형의 실험에서 재관류물에 첨가될 때 또는 협혈의 유발시 첨가될 때 보호제로서 집중적으로 연구되었다. 재조합 SOD의 이용가능성으로 인해 뇌 및 척수의 재관류상해(Uyama et al., Free Radic. Biol. Med. 8: 265, 1990; 및 Lim et al., Ann. Thorac. Surg. 42: 282, 1986), 내독혈증(Schneider et al., Circ. Shock 30: 97, 1990; 및 Schneider et al., Proc. Clin. Biol. Res. 308: 913, 1989), 심근 경색(Patel et al., Am. J. Physiol. 258: H369, 1990; Mehta et al., Am J. Physiol. 257: H1240, 1989; Nejima et al., Circulation 79: 143, 1989; Fincke et al., Arzneimittelforschung 38: 138, 1988; 및 Ambrosio et al., Circulation 75: 282, 1987) 및 골관절염 및 장 협혈(Vohra et al., J. Pediatr. Surg. 24: 893, 1989; 및 Florea L., Mol. Cell. Biochem. 84: 123, 1988)을 포함한 여러 의학적 상태를 치료 또는 예방하는데 SOD의 투여 효과가 보다 집중적으로 평가될 수 있었다. 과산화물 디스뮤타제는 또한 전신성 홍반성 루푸스(Systemic lupus erythematosus), 크론병, 위궤양, 산소 독성, 화상 환자, 이식 후의 신부전증 및 헤르페스 심플렉스 감염을 치료하는데 양성 효과를 나타내는 것으로 보고되었다.

<80> 옥시라디칼-유도된 손상을 방지하는 또 다른 전략은 과산화물과 같은 옥시라디칼이 일단 형성된 후 이를 옥시라디칼을 전형적으로는 촉매적으로라기 보다는 화학량론적으로 작용하는 소분자 스캐빈저를 사용하여 청소하는 것이다. 글루타티온의 유사체들이 여러 동물 모델에서 옥시라디칼 손상을 약화시킨 위해 사용되었다. 예를 들면, N-2-메르캅토프로피오닐글리신은 심근 협혈 및 재관류의 개 모델에서 보호 효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다(Mitsos et al., Circulation 73: 1077, 1986). N-아세틸시스테인은 양에서

내독소의 독성을 치유하는데 사용되었다(Bernard et al., Invest. 73: 1772). 디메틸 티오우레아(DMTU) 및 부틸-α-페닐니트론(BPN)은 하이드록실 라디칼 HO[·]을 청소하는 것으로 알려져 있고 랫트 심근 및 토끼에서 허혈-재관류 손상을 경감시키는 것으로 제시되었다(Vander Heide et al., J. Appl. Physiol. 63: 2462, 1987). 만니톨은 재산소포화 동안에 기관 손상을 감소시키는 유리 라디칼 스캐빈저로 사용되었다(Fox RB, J. Clin. Invest. 74: 1456, 1984; 및 Ouriel et al., Circulation 72: 254, 1985).

<81> 따라서, 옥시라디칼 형성 억제제 및/또는 과산화물 및 과산화수소를 제거하는 효소 및/또는 옥시라디칼 스캐빈저로서 작용하는 소분자 모두는 여러 허혈 병리 상태에 나타나는 재산소포화 손상을 방지하거나 유리 라디칼과 연관된 여러 질병 상태를 치료 또는 방지하는 가능성을 제시하여 왔다. 그러나, 이들 부류의 분자들은 많은 유해한 특성을 나타낸다. 예를 들면, 옥시라디칼 형성의 억제제는 전형적으로 정상적인 생리 및 호흡에서 필수적인 효소 과정에 사용되는 전이 금속을 킬레이트화한다. 게다가, 이들 억제제는 아주 높은 용량에서 조차 옥시라디칼 형성을 완전히 방지하지 못한다. 과산화물 디스밀타제 및 카탈라제는 고가의 제조 비용을 치러야하는 큰 폴리펩타이드이고, 세포 또는 혈액-뇌 장벽을 침투하지 못하며, 일반적으로 비경구 투여 경로를 요구한다. 유리 라디칼 스캐빈저는 화학량론적으로 작용하며 이에 따라 쉽게 고갈되며 효과를 보기 위해서는 고용량으로 투여해야 한다.

<82> 유리 라디칼-연관된 질환 또는 상태는 적어도 부분적으로 유리 라디칼, 특히 옥시라디칼 및 기타 반응성 산소 종의 생체내 생성 또는 노출에 의해 발생되는 병리학적 상태를 가리킨다. 대부분의 생리학적 상태는 질병 상태의 유발 요인이 다수이고 질병 상태의 주요 병인을 찾아내는 것이 극히 어렵다는 관점에서 다수병인성이다. 이러한 이유로

인하여 유리 라디칼-연관된 질환은 유리 라디칼 또는 반응성 산소 종에 의한 손상이 질병 상태의 병인에 기여하는 것으로 믿어지거나 유리 라디칼 억제제(예, 데스페리옥사민), 스캐빈저(예, 토코페롤, 글루타티온) 또는 촉매(예, SOD, 카탈라제)의 투여가 증상을 경감시키거나 생존을 증가시키거나 병리 상태를 치료 또는 예방하는데 있어 검정가능한 임상적 수혜를 제공함으로써 검정가능한 수혜를 제공하는 것으로 나타나는 상태로서 본 분야에서 인식되는 병리학적 상태를 포함한다. 예를 들면, 이들로 한정되는 것은 아니지만, 다음의 질병 상태가 포함된다: 허혈 재판류 상해, 염증 질환, 전신성 홍반성 루푸스, 심근 경색, 발작, 외상성 출혈, 척수 외상, 크론병, 이식 거부, 건선, 성인 호흡 곤란 증후군, 천식, 다발성 기관 이상, 염증성 장 질환, 알레르기성 비염, 자가면역질환(류마티스성 관절염, 당뇨병), 녹내장 형성, 포도막염, 기종, 위궤양, 동맥경화, 고혈압, 울혈성 심장 이상, 혈관성형술, 심장 내막염, 산소 독성, 신생물, 부적절한 세포 아폽토시스, 방사선 숙취, 독혈증, 급성 폐 손상 등. 이러한 질병은 아폽토시스를 겪도록 자극받은 세포에서 중요한 세포 성분에 손상을 가하는(예, 지질과산화) 반응성 산소 종(예, O_2^- , HOOH)을 가리키는 아폽토시스-연관된 ROS를 포함할 수 있다. 이러한 아폽토시스-연관된 ROS는 아폽토시스 자극에 반응하여 세포에서 형성되고/되거나 비-호흡 전자 수송 연쇄에 의해 생성될 수 있다(즉, 산화 인산화에 의해 생성된 ROS가 아닌 다른 것).

<83> 다른 관점으로서, 본 발명은 이식 세포에서 면역억제제 사이클로스포린 A 또는 이의 유사체에 의해 발생되는 독성을 감소시키기에 유효한 양의 PPIase 활성을 갖는 사이클로필린 단백질을 발현하는 재조합 발현 벡터를 포함함을 특징으로 하여, 이식 세포에

서 상기 사이클로필린 단백질의 과발현을 유도하여 사이클로스포린 A 또는 이의 유사체에 의해 발생되는 독성을 완화하는 약제학적 조성물을 제공한다.

<84> 사이클로스포린 A(CsA)는 이의 아미노산의 종류에 따라 25개 이상의 유사체가 있는 것으로 알려져 있다[Traber R., HELVETICA ACTA, 70, 13, 1987]. 사이클로스포린 A의 유도체의 예로는 국제특허출원 공개번호 WO 98/28328, WO 98/28329 및 WO 98/28330은 3번 위치의 아미노산 잔기 사르코신이 수식된 사이클로스포린 A 유도체를 들 수 있다. 또한, 미국특허 제5,318,901호 및 EP 0 414 632 B1는 8번 위치의 아미노산 잔기가 수식된 사이클로스포린 A의 유도체를 개시하였다. 또한, 국제특허출원 공개번호 WO 93/17039는 1번 위치의 아미노산 잔기가 수식된 이소-사이클로스포린 산 부가염을 제시하고 있다. 상기 유사체 모두는 사이클로스포린 A와 마찬가지로 면역억제제로서 효능을 나타내며 이들로부터 유발되는 독성에 대하여 본 발명이 적용될 수 있다. 본 발명에서 독성은 기관 또는 세포 이식 후 CsA 또는 이의 유사체의 처치에 의해 유해하게 세포소멸 및 근육분화 차단이 발생하는 것을 의미한다.

<85> 이식 세포에서의 사이클로필린 단백질의 과발현은 유전자 요법을 통해 달성할 수 있다. 유전자 요법의 보편적인 프로토콜로서, 본 발명의 한 양태는 외부의 유전자를 레트로바이러스나 아데노바이러스와 바이러스 벡터에 넣은 뒤 목적하는 표적 세포에 감염시켜 진행하는 것이다. 본 발명의 다른 양태는 형질감염된 세포를 이용하여 유전자 요법을 시행하는 것이다. 즉, 사이클로필린 유전자를 분리된 이식 세포에 바로 형질감염시키고, 형질감염된 세포중에서 사이클로필린 단백질을 많이 만드는 고-생성 세포 (high-producing cell)만을 사용하여 유전자 요법을 하는 것이다. 이러한 방법으로 유전자 요법을 하는 것은 적당한 전달 시스템의 요건인 높은 전파 효율(hight efficiency of

transmission), 외래 유전자의 안정한 복제(stable replication of foreign DNA), 적절하고 조절된 발현(appropriate/regulated expression) 및 전달 시간 동안의 충분한 안전성(adequate safety over the time of transfer)을 충족한다. 유전자 요법의 임상 프로토콜은 본 분야에 잘 알려져 있으며 문헌[E H Oldfield, Human Gene Therapy 4:39-69 (1993)]에 기재된 내용을 참고로 할 수 있다. 사람 유전자 요법 프로토콜은 Office of Recombinant DNA Activities of the National Institutes of Health in Bethesda Maryland로부터 얻을 수 있다.

<86> 형질감염은 일반적으로 발현성 폴리뉴클레오타이드(예, 유전자, cDNA 또는 mRNA)를 세포내로 유입하는 과정으로 정의될 수 있다. 형질감염된 세포에서 코딩하고 있는 폴리뉴클레오타이드의 성공적인 발현은 세포내에서의 정상적인 단백질의 생성을 유도한다. 한 가지 양태로서, 본 발명은 이식 세포내로 사이클로필린을 코딩하는 DNA를 전달하기 위해 사이클로필린을 코딩하는 핵산을 포함한 재조합 발현 벡터를 유전자 요법용 작제물로서 사용한다. 세포는 사이클로필린 단백질이 발현되는 조건하에서 재조합 발현 벡터로 형질감염된다. 사이클로필린의 발현은 세포에서의 과발현을 유도한다. 본 발명의 한 가지 양태는 사이클로필린의 과발현이 유도되어 사이클로스포린 A 또는 이의 유사체에 대해 내성을 갖는 이식 세포를 제공한다. 이와 관련하여 본 발명의 추가의 양태는 사이클로필린을 코딩하는 유전자를 작동적으로 연결되도록 벡터에 도입하여 재조합 발현 벡터를 제조하고, 재조합 발현 벡터를 이식 세포에 감염시켜 배양하고, 배양물로부터 사이클로필린이 과발현된 세포를 분리함을 포함함을 특징으로 하여, 사이클로스포린 A 또는 이의 유사체에 대해 내성을 갖는 이식 세포를 제조하는 방법을 제공한다.

<87> 본 발명에서 용어 "벡터"는 일반적으로 사이클로필린 유전자의 핵산 분자를 연결하여 수송할 수 있는 핵산 분자를 가리키며 플라스미드, 코스미드 또는 바이러스 벡터를 포함할 수 있다. 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합할 수 있다. 벡터는 숙주 이식 세포에서 핵산의 발현에 적합한 형태로 사이클로필린 핵산 분자를 포함할 수 있다. 바람직하게는 재조합 발현 벡터는 발현된 사이클로필린 핵산 서열에 작동적으로 연결된 하나 이상의 조절 서열을 포함한다. 용어 "조절 서열"은 프로모터, 인핸서(enhancer) 및 다른 발현 조절 요소(예, 폴리아데닐화 시그널)을 포함한다. 조절 서열은 뉴클레오파이드 서열의 구성적 발현(constitutive expression)을 지시하는 것뿐만 아니라 조직-특이적 조절 및/또는 유도성 서열을 포함한다. 발현 벡터의 설계는 형질감염될 숙주 세포, 원하는 발현 수준 등과 같은 요소에 의해 결정될 수 있다. 본 발명의 재조합 발현 벡터는 이식 세포에서 사이클로필린 단백질의 과발현을 위해 설계될 수 있다. 한 양태로서, 재조합 발현 벡터는 핵산의 발현을 특정 세포 유형에서 선택적으로 지시할 수 있다. 예를 들면 조직-특이적 조절 요소가 핵산의 발현을 위해 사용된다.

<88> 유전자 요법에서 사용하는 바람직한 벡터는 바이러스 벡터이며 예를 들면 이들로 한정되는 것은 아니지만 복제 결손 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-연관된 바이러스가 포함된다. 바이러스 벡터는 다음의 기준을 충족해야한다: (1) 벡터는 원하는 세포에 감염할 수 있어야 하며 이에 따라 적절한 숙주 범위를 갖는 바이러스 벡터가 선택되어야 하고; (2) 전달된 유전자는 적절한 기간 동안 세포에서 보존되고 발현될 수 있어야 하며; (3) 벡터는 숙주에 안전해야 한다. 세포내로 유전자 전달을 위해 사용할 수 있는 다른 바이러스 벡터로는 몰로니 뮤린 류케미아 바이러스(MMLV)와 같은 레트로바이러스; JC, SV40, 폴리오마, 아데노바이러스와 같은 파보바바이러스; 엡스타인-바르 바이

러스(EBV); 보바인 파필로마 바이러스 타입 I(BPV)와 같은 파필로마 바이러스; 백시니아 및 폴리오바이러스 및 기타 사람 및 동물 바이러스가 포함된다.

<89> 다른 방도로서, 비바이러스성 및 비단백질성 백터, 바이러스성 백터(예, 아데노바이러스, 헤르페스 바이러스, 백시니아, 레트로바이러스), 리포좀에 캡슐화된 DNA, 지질 전달 비히클 및 네이키드 DNA를 포함한 많은 방법 및 전달 비히클이 사용될 수 있다.

<90> 숙주 발현 시스템은 본 분야에 잘 알려져 있으며 한 양태로 사용된다. 포유동물 프로모터는 포유동물 RNA 폴리머라제와 결합하고 사이클로필린 단백질의 코딩 서열을 mRNA로 하류(3') 전사를 개시할 수 있는 DNA 서열은 어느 것도 가능하다. 프로모터는 보통 코딩 서열의 5' 말단에 근접하여 위치하고 있는 전사 개시 영역 및 전사 개시 부위의 상류에 위치한 25 내지 30개의 염기쌍을 이용하는 TATA 박스를 갖는다. TATA 박스는 정확한 위치에서 RNA 합성이 이루어지도록 RNA 폴리머라제 II를 지시하는 것으로 여겨진다. 포유동물 프로모터는 또한 전형적으로 TATA 박스의 100 내지 200개 염기쌍 상류에 위치한 상류 프로모터 요소를 함유한다. 상류 프로모터 요소는 전사 개시 속도를 결정하며 어느 방향으로든 작용할 수 있다. 포유동물 프로모터로 특별히 사용될 수 있는 것은 포유동물 바이러스 유전자로부터 유래된 프로모터인데 그 이유는 바이러스 유전자가 흔히 고도로 발현되고 넓은 숙주 범위를 갖고 있기 때문이다. 이의 예로는 SV40 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스 LTR 프로모터, 아데노바이러스 메이저 후기 프로모터 및 헤르페스 심플렉스 바이러스 프로모터를 들 수 있다.

<91> 예로서, 사이클로필린 유전자를 T7 발현 백터(Rosenberg, et al., Gene, 56:125-135, 1987)와 같이 아주 치밀하게 조절되는 프로모터에 작동적으로 연결시킴으로써 달성할 수 있다. 강력한 백터의 삽입은 사이클로필린 유전자의 양쪽 말단

근처에 간편한 제한 표적과 그 프로모터 근처에 벡터상에 적격한 제한 표적을 동정하고 사이클로필린 유전자가 그 강력한 프로모터의 전사 및 해독 조절하에 배향하도록 벡터내로 삽입시켜 달성할 수 있다. 다른 방도로서, 사이클로필린 유전자는 이 유전자의 상류에 강력한 리보솜 결합 부위를 설정하여 유전자의 발현을 증가시킴으로써 과발현될 수 있다(Shine and Dalgarno, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71:1342-1346, 1974).

<92> 전형적으로 포유동물 세포에 의해 인지되는 전사 종결 및 폴리아데닐화 서열은 해독 종결 코돈의 3'에 위치한 조절 영역이며, 이에 따라 프로모터 요소와 함께 코딩 서열에 인접한다. 성숙 mRNA의 3' 말단은 부위-특정 해독후 절단 및 폴리아데닐화에 의해 형성된다. 전사 터미네이터 및 폴리아데닐화 시그널의 예로는 SV40으로부터 유래된 것을 들 수 있다.

<93> 외인성 핵산을 이식 세포내로 도입하는 방법은 본 분야에 잘 알려져 있으며 사용된 숙주 세포에 따라 다양할 수 있다. 도입 기술로는 텍스트란-매개된 형질감염, 전기충격 (electroporation), 인산칼슘 침전, 폴리브렌(polybrene) 매개된 형질감염, 원형질체 (protoplast) 융합, 리포솜에 폴리뉴클레오타이드의 캡슐화 및 DNA를 핵으로 직접적인 미세주사가 포함된다.

<94> 여러 분리된 세포가 조직 또는 기관의 분리 및 이식에 대한 표준 기술을 이용하여 이식될 수 있다. 비-자가 세포는 세포 유형을 적절히 정합시키고 사이클로스포린과 같은 면역억제제를 사용하여 이식된다. 사용되는 세포는 사람에게 이식되는 사람 세포이며 전형적으로 실질세포(parenchymal cells), 즉 근본적으로 구조적

기능보다 기능적으로 작용하는, 기관 세포를 사용한다. 기관의 예로는 간, 췌장, 장, 요로내피 세포(uroendothelial cells)(재생성 및 요로상피 구조체를 포함), 유방 조직을 형성하는 세포 및 기타 연부 조직 및 내분비 조직이 포함된다. 또한, 연골(연골세포, 섬유아세포), 건(건세포) 및 골(골세포)와 같은 기본적으로 구조 기능을 갖는 조직으로부터 유도될 수 있다. 본 발명은 근모세포(myoblast), 근육대통세포 및 미성숙(young) 근섬유 세포로 이루어진 군에서 선택된 근원성(myogenic) 세포를 포함한다. 세포는 정상적인 세포이거나 추가 기능 또는 정상적인 기능이 부여되도록 유전공학적으로 조작된 것일 수 있다.

<95> 본 발명의 조성물은 상기한 유효성분 이외에 알려진 항산화제를 더 함유할 수 있다. 항산화제의 종류는 그 종류가 특별히 한정되지 않지만, 당분야에서 CSA에 의해 유발된 ROS의 제거용으로 공지된 모든 종류의 항산화제를 사용할 수 있으며, 예를 들면 카탈라제, DFOM(데페록사민 메실레이트) 또는 트리온(Trion, 4,5-디하이드록시-1,3-벤젠-디설폰산)이 포함된다.

<96> 본 발명의 약제학적 조성물은 다양한 투여 방법이 사용될 수 있다. 예를 들면 비경구, 국소, 점막내 또는 체강으로의 주사에 의해 투여될 수 있다.

<97> 본 발명의 약제학적 조성물에 함유되는 재조합 발현 벡터의 효과적인 DNA 용량은 일반적으로 약 0.05 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 보통 약 0.005 내지 5 mg/kg이다. 그러나, 일반적으로 인식되는 바와 같이, 이 용량 범위는 투여 방법, 표적 세포, 발효 수준 등과 같은 많은 요소에 의해 변할 수 있다.

<98> 조성물은 관련된 모든 생리학적 용액을 포함하여 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 이러한 담체로는 분산 매질, 피복제, 항균제, 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등이 포함된다.

<99> 본 발명은 이식 세포를 CsA에 사전 노출시킨 후 생존한 세포가 가역적으로 증식 및 분화할 수 있을 뿐만 아니라 추가적인 CsA 노출에도 내성을 갖는다는 발견을 기초로 한다. 이에 본 발명은, 또 다른 관점으로서, 이식 세포를 사이클로스포린 A 또는 이의 유사체로 처리하여 배양하고, 배양물로부터 생존 세포를 회수함을 특징으로 하여, 사이클로스포린 또는 이의 유사체에 대해 내성을 갖는 이식 세포를 제조하는 방법을 제공한다. 이식 세포의 배양은 본 분야에 잘 알려진 통상적인 방법에 따라 수행할 수 있으며, 예를 들면, 100mm 페트리 디쉬(*petri dishes*)에서 이식 세포를 10%(v/v) 공여 송아지 혈청과 항생제 혼합물이 추가로 첨가된 증식배지에 유지한 후 이를마다 배지를 가라주고 디쉬의 80% 정도 찰 때 세포를 1:3으로 새로운 디쉬에 분조한다.

<100> 배양된 세포는 혼탁액, 캡슐, 마이크로스페어에 부착 또는 생체분해성 또 비생체분해성 고분자 섬유를 통해 이식될 수 있다(Hansen, et al., Austin, Tex.: R. G. Landes, 1993; 96-106). 한 가지 양태로서, 가단할 수 있는 이온성 하이드로겔을 형성할 수 있는 칼슘 알기네이트 및 특정 다른 고분자를 사용하여 세포를 캡슐화한다. 하이드로겔은 알긴산의 음이온성 염을 칼슘 양이온과 가교시켜 제조한다. 알기네이트 용액을 이식 세포와 혼합하여 알기네이트 혼탁액을 형성한다. 이 혼탁액은 경화되기 전에 환자에게 직접 주사한다.

<101> 체내 이식을 위해 세포와 혼합되는 고분자 물질은 하이드로겔을 형성한다. 하이드로겔은 유기 고분자(천연 또는 합성)가 공유, 이온 또는 수소 결합을 통해 가교하여 삼차원 개방-격자 구조를 형성하며 이 구조는 물 분자를 포획하여 겔을 형성한다. 하이드로겔을 형성하기 위해 사용될 수 있는 물질의 예로는 알기네이트와 같은 다당류, 폴리포스파진, 폴리아크릴레이트 또는 온도 또는 pH에 의해 가교되는 블록 공중합체(PluronicsTM 또는 TetronicsTM)를 들 수 있다. 다른 물질로는 피브린과 같은 단백질, 폴리비닐피롤리돈과 같은 고분자, 하이알루론산 및 콜라겐이 포함된다.

<102> 바람직한 양태로서, 세포 혼탁액은 다음과 같이 얻는다. 고분자를 고분자 하이드로겔을 형성하는 농도로, 예를 들면 알기네이트의 경우 0.5 내지 2 중량%, 바람직하게는 1 중량%의 농도로 생리학적 pH의 수용액, 바람직하게는 0.1 M 인산칼륨 용액에 용해시킨다. 분리된 이식 세포를 고분자 용액에 1 내지 5천만개 세포/ml, 가장 바람직하게는 천만개 내지 이천만개 세포/ml의 농도로 혼탁시킨다.

<103> 세포 이식용 매트릭스가 또한 형성될 수 있으며 이들 매트릭스는 세포의 증식과 분화가 이식 후에 세포가 혈관내에서 증식하기 전에 일어날 수 있도록 충분한 표면적과 영양분에 노출되어야 한다. 세포는 매트릭스상에 파종한 후 이식하거나 목적하는 부위에 미리 매트릭스를 이식한 후 그 매트릭스내로 세포를 주사하여 이식할 수 있다. 매트릭스는 혈관내에서의 성장을 위해 유연하고, 무독성이며, 주사가능한 다공질 주형이어야 한다. 바람직한 양태로서, 매트릭스는 폴리안하이드라이드, 폴리오르토에스테르, 폴리락트산, 폴리글리콜한 및 이들의 공중합체 또는 블렌드와 같은 생체흡수성, 생체분해성, 합성 고분자로부터 형성된다. 비분해성 물질이 또한 매트릭스를 형성하는데 사용될 수 있다. 적합한 물질의 예로는 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리비닐 알코올의 유도체, 테플론 및 나

일론이 포함된다. 일부 양태로서, 고분자에 세포를 흡착시키는 것은 고분자를 기저 막 성분, 한천, 아가로즈, 젤라틴, 겸 아라빅, 콜라겐 I, II, III, IV 및 V, 피브리넥틴, 라미닌, 글라이코사미노글리칸 등과 같은 화합물로 피복하여 증가시킬 수 있다.

<104> 본 발명에 따라 사이클로필린 단백질의 과발현이 사전에 유도된 이식 세포는 이식 후에 면역억제제로서 사이클로스포린 A 또는 이의 유사체의 처치에 따른 독성을 예방함으로써 세포의 이식 성공률을 높을 수 있다. 본 발명의 한 양태는 사이클로스포린 A의 과발현이 유도된 근모세포를 제공한다. 이러한 본 발명의 근모세포는 근육병 등의 근육의 퇴화 및 약화와 관련된 질환의 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

<105> 본 발명은 하기 실시예로 예시된다. 이들 실시예들은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것일 뿐 한정하는 것은 아니다. 한편, 실시예들에서 결과는 최소한 3개의 독립적인 실험에서 얻은 자료를 평균 ± 표준편차로 표시하였으며 스튜던트 티-테스트(Student's t-test) 및 일원배치 분산분석(One-Way ANOVA)을 이용하여 통계 분석하였다. 특별히 언급이 없는 한 $P < 0.05$ 를 유의한 것으로 보았다.

<106> 하기 실시예에 사용된 재료는 다음과 같이 입수하였다. 둘베코 변형된 이글

배지(Dulbecco's modified Eagle's Medium, DMEM), 둘베코 변형된 이글 배지/F-12(Dulbecco's modified Eagle's Medium/F-12, DMEM/F-12), 태아 소 혈청, 공여 송아지 혈청(donor calf serum), 리포펙틴(lipofectin) 및 G418은 GIBCO/BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였고, Ham's F-10 배지, 콜라게나제, L-페닐에프린(L-phenylephrine), 카탈라제(catalase), 2',7'-디클로로플루오레세인 디아세테이트(2',7'-dichlorofluorescein diacetate, DCF), 3,3'-디헥실옥사카르보시아닌 요오다이드(3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide, DiOC6[3]), 4,5-디하이드록시-1,3-벤젠-디설폰산(Tiron) 및 데페록사민 메실레이트(deferoxamine mesylate, DFOM)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 사이클로스포린 A(CsA), FK506, 아스코마이신 및 카스파제 3 억제제 II(DEVD)는 Calbiochem(San Diego, CA)으로부터 구입하였다. 마이오제닌(myogenin), MRF4, β -액틴, c-myc에 대한 항체들은 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다. 사이클로필린 A(CypA)에 특이 한 단일클론성 항체는 Upstate Biotechnology(Lake Placid, NY, USA)로부터 구입하였다.

<107> 실시예 1

<108> CsA, FK506 및 아스코마이신의 칼시뉴린 인산효소 활성 억제

<109> CsA는 분화과정 중에 일시적으로 증가하는 칼시뉴린(calcineurin) 인산효소 활성을 억제시키기 때문에 몇몇 연구자들은 CsA에 의한 분화차단이 칼시뉴린 인산효소 활성의

억제에 의해 유발된다고 제안을 하였다(Abbott, K. L. et al., *Mol. Biol. Cell.* 9, 2905-2916, 1998; 및 Friday, B. B. et al., *J. Cell. Biol.* 149, 657-666, 2000). 이에, 본 발명자들은 면역억제제 CsA, FK506 및 아스코마이신이 칼시뉴린 인산효소 활성에 미치는 영향을 조사하였다.

<110> 일차적으로, 칼시뉴린 인산효소 활성을 최대한 억제하는 면역억제제의 농도를 결정하였다. H9c2 쥐의 심장 근모세포(아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션(ATCC), Manassas, VA, USA)를 10%(v/v) 공여 송아지 혈청과 항생제 혼합물(페닐실린 G, 스트렙토마이신 및 암포테리신 B)이 추가로 첨가된 DMEM/F-12 배지[증식배지(Proliferation Medium, PM)]에 유지하였다. 근육분화는 상기 근모세포들이 융합할 때 1%(v/v)의 말 혈청(horse serum, HS)이 추가로 첨가된 DMEM/F-12 배지[분화배지(Differentiation Medium, DM)]에서 유도하였다. DM에 면역억제제 CsA, FK506 및 아스코마이신을 각각 첨가한 후 H9c2 쥐의 심장 근모세포를 2일 동안 배양하여 칼시뉴린의 인산효소 활성을 측정하였다. DM은 매 2 일마다 교환하였다.

<111> 칼시뉴린의 인산효소 활성은 다음과 같이 측정하였다. 상기 배양한 근모세포를 1 ml의 트립신-EDTA에 모은 다음, 칼시뉴린 분석 완충용액(BioMol, Plymouth Meeting, PA, USA) 100ml에 침사 용해시키고, BioMol QuantizymeTM Assay System AK-804를 이용하여 제조업체의 지침서에 따라 칼시뉴린의 인산효소 활성을 측정하였다. 이 지침서에 따라서, 칼시뉴린의 인산효소 활성은 칼시뉴린-특이성 RII 포스포펩타이드에서 방출된 유리-인산(free-phosphate)을 감지하여 미세역가 평판 판독기(microtiter-plate reader)상의 OD_{620nm}에서 측정하였다. 측정된 칼시뉴린 인산 활성은 혈청이 제거된 세포 (serum-starved cell, SF)로 측정한 값으로 표준화하였다.

<112> 한편, L-페닐에프린(L-phenylephrine, PE)으로 칼시뉴린 인산효소 활성을 유도하기 위하여, 먼저 무혈청 DMEM/F-12 배지 내의 세포혈청을 4시간 동안 제거한 다음, 12시간 동안 PE를 처리하였다. 이때, 면역억제제는 PE를 첨가하기 30분전에 첨가하였다. 이후 PE 유도 칼시뉴린 인산 활성을 측정하였다.

<113> 상기한 방법으로 측정한 칼시뉴린 인산효소 활성을 도 1에 나타내었다. 도 1에서 각각의 값은 혈청 제거 12시간 후에 측정한 칼시뉴린 인산효소 활성을 기초 활성으로 하여, 기초활성과 비교한 결과를 배수(fold)로 나타낸 것이다.

<114> 도 1로부터 알 수 있듯이, 대조군에서 DM 및 PE에 의해 유도된 칼시뉴린 인산효소 활성은 기초활성에 비하여 각각 약 2.1배 및 2.7배 증가되었다. 증가된 칼시뉴린 인산효소 활성에 대한 최대한의 억제효과는 $2.5 \mu M$ 의 CsA, $1 \mu M$ 의 FK506 및 $20nM$ 의 아스코마이신에서 관찰되었다. 그러나, 이후 실험에서는 유도된 칼시뉴린 인산효소 활성의 억제를 보증하기 위해 $9 \mu M$ 의 FK506 및 $200nM$ 의 아스코마이신이 사용되었다. 기초 활성은 고농도의 이 약제들에 의해 영향을 받지 않았다. PE에 의해 증가된 칼시뉴린 인산효소 활성에 대한 약제들의 억제 효과를 양성 대조군으로 삼았다. 결론적으로, CsA, FK506 및 아스코마이신은 근육분화과정에서 유도된 칼시뉴린 활성을 완전히 억제시킬 수 있지만, 기초활성에는 영향을 미치지 않았다.

<115> 실시예 2

<116> 근육분화 및 세포소멸에 대한 CsA, FK506 및 아스코마이신의 영향

<117> 2-1. 쥐의 심장 근모세포의 근육분화에 대한 CsA의 영향

<118> CsA, FK506, 아스코마이신 및 SDZ NIM811이 H9c2 쥐 심장 근모세포의 분화에 어떤 영향을 미치는지 조사하였다. SDZ NIM811은 칼시뉴린 억제 효과가 없는 CsA 유사물질이다.

<119> H9c2 쥐 심장 근모세포를 CsA, FK506, 아스코마이신 및 SDZ NIM811가 각각 첨가된 DM에서 72시간 동안 배양한 후, 세포를 분리하여 근육분화시의 형태학적 변화를 관찰하였다. 그 결과는 도 2a에 나타나 있다. 이때, 상기 약물들을 함유하지 않는 배지에서 배양한 근모세포를 대조군으로 삼았으며, 근모세포는 PM에서 약 70% 포화성장 (confluence) 후 사용하였다.

<120> 도 2a로부터 CsA 또는 SDZ NIM811로 처리한 경우에는 근모세포의 분화가 차단되고 세포의 수가 감소하는데 반하여, FK506 또는 아스코마이신으로 처리한 경우에는 대조군과 비교하여 형태학적 변화를 유발하지 않는다는 것을 알 수 있다.

<121> 또한, 초기 및 말기 근원성(myogenic) 표식자인 미오제닌(myogenine)과 MRF4단백질의 발현정도를 측정하기 위하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 웨스턴 블롯은 약물을 처리한 근모세포 추출물을 SDS-PAGE로 분리하여 니트로셀룰로스막 위로 옮기고, 차단한 후, 막을 지정된 1차 항체(폴리클로날 미오제닌(myogenine) 항체 및 폴리클로날 MRF4 항체)(Santa Cruz, CA, USA)와 반응시켰고 이어서 2차 항체(1차 항체감지가능한 화학발광 체반응효소를 함유한 항체 항-토끼 IgG-HRP)(Santa Cruz, CA, USA)와 반응시켰다. 최종적으로 표본을 강화된 ECL-plus 화학발광(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ,

USA)으로 감지하였다. 대조군으로는 비근원 단백질인 β -액틴을 사용하였다. 그 결과를 도 2b에 나타내었다.

<122> 도 2b로부터 알 수 있는 바와 같이, CsA 및 SDZ NIM811는 1 μ M의 농도에서는 부분적인 억제를, 더 높은 농도에서는 완전한 억제를 보였다. 그러나, FK506과 아스코마이신은 영향을 미치지 않았다.

<123> 2-2. 쥐의 심장 근모세포의 세포소멸(apoptosis)에 대한 CsA의 영향

<124> CsA의 세포소멸에 대한 영향을 측정하기 위하여 인 시튜 투넬분석(In-Situ TUNEL assay) 및 DNA 분절(DNA fragmentation)을 분석하였다.

<125> CsA, FK506, 아스코마이신 및 SDZ NIM811로 처리한 각 DM에서 72시간 동안 배양한 H9c2 근모세포 한 층을 도말 슬라이드 표본에 입히고, 1% 파라포름알데히드로 고정한 후, ApopTag Fluorescein *In situ* Apoptosis Detection 키트(Intergen, Purchase, NY)을 이용하여 투넬분석을 수행하였다. 그 결과는 도 2c에 나타나 있다. 한편, 도 2c에서 화살표는 투넬 양성 세포를 의미한다.

<126> 세포가 사멸하게 되면 DNA가 엔도뉴클레아제의 작용을 받아서 180~200bp 반복으로 잘려지게 되며, 아가로스 겔 상에서 분리해 볼 경우 마치 사다리와 같은

DNA 밴드 패턴이 나타나게 되는데, 이러한 DNA 사다리꼴 패턴(DNA ladder pattern)의 발생을 확인하는 것이 DNA 분절로서 다음과 같은 방법으로 실시하였다. CsA, FK506, 아스코마이신 및 SDZ NIM811로 처리한 DM에서 72시간 동안 배양한 H9c2 근모세포들을 용해 완충용액(50mM Tris-HCl(pH 7.5), 100mM NaCl, 20mM EDTA 및 0.5% SDS 함유)에서 용해하였다. 그 다음, 세포 용해액을 50 μ g/ml의 RNase A로 37°C에서 2시간 동안 처리한 후, 500 μ g/ml의 프로테인아제 K로 55°C에서 2시간 동안 처리하였다. DNA를 폐놀/클로로포름 방법으로 추출한 후, 70%(v/v) 이소프로판을로 침전시키고, 이를 15,000rpm으로 15분간 원심분리하여 그 침사를 TE 완충액(10mM Tris-HCl(pH 8.0), 1mM EDTA)에 용출하였다. DNA는 1.5% 한천 겔(agarose gel)에서 전기영동법을 이용하여 분석하였다. 그 결과를 도 2d에 나타내었다.

<127> 도 2c 및 2d로부터 CsA와 SDZ NIM811에 의한 세포소멸은 용량에 비례하여 발생하였지만, FK506과 아스코마이신은 세포소멸과 관련이 없음을 알 수 있다.

<128> 2-3. 쥐의 사지 골격근의 근육분화 및 세포소멸에 대한 CsA의 영향

<129> H9c2 근모세포는 분화 이후에 골격근의 특징적인 모양을 보였지만 쥐의 심장 근모세포에서 기원한 것이다. 따라서, 비교를 위하여 4일생 Sprague-Dawley 쥐의 사지 골격근에서 얻은 근모세포를 이용하여 CsA, FK506, 아스코마이신 및 SDZ NIM811의 분화 및 세포 사멸에 대한 영향을 조사하였다.

<130> 4일생 Sprague-Dawley 쥐의 사지로부터 분리한 근육조직을 잘게 저민 후, 콜라겐분해효소(collagenase 2000 U)가 함유된 37°C의 무혈청 DMEM/Ham's F-10(1:1, v/v)에서 24

시간 동안 배양하였다. 저속 원심분리로 세포를 모은 후, 10% 우태아 혈청과 1% 항생제(페닐실린 G 및 암포테리신 B)가 함유된 DMEM/Ham's F-10 (1:1, v/v)에 다시 부유시켰다. 이 세포들을 37°C에서 페트리 접시에 고밀도로 이식하였다. 다시 세포를 분리하여 CsA, SDZ NIM811, FK506 및 아스코마이신으로 각각 처리한 DMEM/Ham's F-10(1% 말 혈청을 함유)에서 72시간 동안 배양한 다음, 상기 2-1 및 2-2에서와 동일한 방법으로 형태학적 분석, 웨스턴 블롯, 튜넬 분석 및 DNA 분절을 수행하였다. 그 결과를 도 3a 내지 도 3d에 나타내었다.

<131> 도 3a 내지 도 3d로부터, 쥐의 사지 골격근 유래 근모세포는 H9c2 근모세포와 유사한 결과를 나타낼 수 있다.

<132> 상기한 결과들은 이전의 연구들(Abbott, K. L. et al., Activation and cellular localization of the cyclosporine A-sensitive transcription factor NF-AT in skeletal muscle cells, *Mol. Biol. Cell.* 9, 2905-2916, 1998; Friday, B. B. et al., Calcineurin activity is required for the initiation of skeletal muscle differentiation, *J. Cell. Biol.* 149, 657-666, 2000)과는 달리, 분화 과정 중의 칼시뉴린 인산효소 활성의 유도가 근육분화에 필수적이지 않다는 것을 의미한다.

<133> 2-4. 근육분화 단계 동안 CsA가 근육분화 및 세포소멸에 미치는 영향

<134> 초기(myogenin expression)에 근육분화 차단을 모면한 세포들은 분화 후기(MRF4 expression)로 진행되기 때문에, 후기의 근세포에서는 CsA의 독성효과가 감소할 것이다.

이를 확인하기 위하여, 근육분화 단계별로 CsA가 근육분화 및 세포소멸을 차단하는지를 다음과 같은 방법으로 확인하였다.

<135> DM에서 세포를 24시간, 48시간 및 72시간 배양하는 동안의 세포의 형태학적 변화를 관찰하였다. 그 결과를 도 4의 a, b 및 c에 나타내었다. 그 다음, 각각의 세포에 10 μ M의 CsA를 처리한 다음, 72시간 동안 더 배양하고, 세포의 형태학적 변화를 관찰하였다. 이 결과는 도 4의 d, e 및 f로 나타났다.

<136> 도 4로부터 근육대통세포(myotube)가 형성되기 전 단계인 24시간 및 48시간에서 DM 내의 세포는 독성 효과를 보이지만(a, b, d 및 e 참조), 72시간에 분화된 근육대통세포들(c 및 f 참조)은 CsA 독성에 저항을 보여서 세포 수의 감소나 형태학적 변화를 보이지 않았다는 것을 알 수 있다.

<137> 실시예 3

<138> ROS 생성을 통한 CsA의 세포소멸 유도

<139> 3-1. CsA에 의한 ROS의 생성 및 항산화제와 ROS의 양과의 관계 확인

<140> PM 및 DM에서 H9c2 근모세포를 각각 24시간 동안 배양한 후, 세포를 분리하고, 37 $^{\circ}\text{C}$ 의 10 μM DCF(2',7'-dichlorofluorescein)에서 20분 동안 배양하였다. 이를 PBS로 1회 세척한 다음, 800ml의 PBS에 다시 부유시키고, 유식세포측정기(flow cytometry; FACS)로 ROS(Reactive Oxygen Species) 양을 측정하여 각각을 대조군으로 하였다. 그

다음, PM을 DM으로 전환하고, $10 \mu M$ 의 CsA 및 $10 \mu M$ 의 SDZ NIM811을 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 세포내 ROS양을 상기에서와 동일하게 FACS 분석으로 측정하였다. 또한, CsA를 처리하기 30분 전에 $0.4mM$ 의 DFOM(deferoxamine mesylate)과 2000 unit/ml 의 카탈라제를 첨가하고, $10 \mu M$ 의 CsA를 첨가하여 24시간 동안 배양한 후, 세포내 ROS양을 상기에서와 동일하게 FACS 분석으로 측정하였다. 그 결과를 도 5a에 나타내었다. 도 5a에서 숫자는 ROS 양의 평균 \pm 표준편차를 의미한다.

<141> 도 5a로부터 DM에서 24시간 동안 CsA 및 SDZ NIM811으로 처리한 후에는 분화와 관련된 ROS양이 각각 680 ± 8 및 634 ± 20 으로 약물을 처리하지 않은 DM에서 배양한 세포의 ROS보다 5배 이상 ROS 수준이 상승하였다(도 5a의 c 및 d 참조). 또한, DFOM 및 카탈라제와 함께 CsA를 처리한 경우에는 ROS 양이 각각 73 ± 12 및 56 ± 9 로 항산화제가 ROS의 생성을 억제한다는 것을 알 수 있다(도 5a의 e 및 f 참조).

3-2. 항산화제의 세포보호 효과

<143> 항산화제는 CsA에 의해 유도된 세포소멸로부터 세포를 보호할 수 있다는 것을 확인하기 위하여, $10 \mu M$ 의 CsA, $0.4mM$ 의 DFOM와 $10 \mu M$ 의 CsA 및 2000 unit/ml 의 카탈라제와 $10 \mu M$ 의 CsA로 처리한 H9c2 근모세포의 형태학적 변화를 관찰하고, 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과를 도 5b에 나타내었다.

<144> 도 5b로부터 항산화제는 CsA에 의한 세포소멸로부터 세포를 보호할 수 있다는 것을 알 수 있다.

<145> 실시예 4

<146> CsA-유도 세포소멸에서 Bax/미토콘드리아 막전위/카스파제 3(caspase 3) 의 역할

<147> 4-1. 웨스턴 블롯 분석에 의한 세포소멸 촉진 단백질인 Bax의 발현 확인

<148> 9 μ M의 FK506, 200nM의 아스코마이신 및 1 내지 10 μ M의 CsA를 함유하는 DM 및 약물을 함유하지 않는 DM(대조군)에서 48시간 동안 배양한 H9c2 근모세포를 사용하여 상기 실시예 2-1과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하였다. 그 결과는 도 6a의 상단 부분에 나타나 있다. 이때, β -액틴은 단백질 로딩을 위한 대조군이다.

<149> 또한, 웨스턴 블롯 분석 띠를 스캐닝한 후, Bio-Rad 영상 덴시토미터(imaging densitometer)로 정량하였다. 그 결과는 도 6a의 하단 부분에 나타내었다. 도 6a의 하단 부분에서, 각각의 막대 그래프는 약물을 처리한 시료를 대조군과 비교하였을 때 Bax 발현양의 배(fold)수의 평균 \pm 표준편차값을 그래프화한 것이다.

<150> 도 6a로부터 CsA 처리는 농도에 비례하여 Bax 발현 수준을 증가시켰으나 FK506 및 아스코마이신 처리는 Bax의 발현에 영향을 미치지 못한다는 것을 알 수 있다.

<151> 4-2. 미토콘드리아 막 전위($\Delta \Psi_m$) 측정

<152> 9 μ M의 FK506, 200nM의 아스코마이신 및 1 내지 10 μ M의 CsA를 함유하는 DM에서 H9c2 근모세포를 48시간 동안 배양한 후, 분리된 세포를 다시 37°C, 40nM의 3,3'-디헥실 옥사카보시아닌 요오다이드(DiOC6[3])에서 30분간 배양한 다음, PBS로 세척하고, 유식세

포측정기로 미토콘드리아 막 전위($\Delta \Psi_m$)를 측정하였다. PM 및 DM에서 배양된 H9c2 근모세포를 가지고 측정한 $\Delta \Psi_m$ 를 대조군으로 하였다. 그 결과는 도 6b에 나타내었다. 도 6b에서 두 번째 피크는 높은 DiOC6[3]의 함량을 갖는 세포들로 생존한 것이고, 첫 번째 피크는 DiOC6[3]의 함량을 갖는 세포(with DiOC6[3] content)들로 소멸된 것이다. 숫자는 감소된 $\Delta \Psi_m$ 를 갖는 근모세포의 퍼센트를 의미한다.

<153> 도 6b에서 알 수 있는 바와 같이, DM에서만 $\Delta \Psi_m$ 의 현저한 저하가 관찰되었고, CsA 처리에 의해 용량에 비례해서 $\Delta \Psi_m$ 가 더욱 감소하였다. 그러나, FK506나 아스코마이신의 경우에는 이러한 감소 효과가 관찰되지 않았다.

<154> 4-3. CsA-유도-세포소멸의 정량화 및 카스파제 3의 기여도 결정

<155> H9c2 근모세포를 CsA, FK506 및 아스코마이신이 각각 함유된 DM배지에서 72시간 동안 배양한 후, 프로피디움 요오드(propidium iodide)로 염색하고, FACS(fluorescence-activated cell scanning) 분석을 수행하였다. 한편, CsA로 처리하기 30분전에 $50 \mu M$ 의 카스파제 3 억제제 II인 DEVD를 처리하고 예비배양을 하였다. 각각의 배양액으로부터 20,000개의 세포를 계수한 후, 각각의 세포주기(G_0/G_1 , S 및 G_2/M)에서의 세포 퍼센트 및 sub- G_0/G_1 분획(즉, 세포소멸)에서의 세포의 퍼센트를 분석하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

<156> 【표 1】

H9c2 심장 근모세포에서 세포주기 및 세포소멸에의 CsA의 투여량에 따른 반응효과

	각각의 세포주기에서의 세포% 및 sub-G ₀ /G ₁ 에서 소멸세포%			
	% G ₀ /G ₁	% S	% G ₂ /M	% 세포소멸
CsA 0 μM	86±3	3±1	4±1	10±2
CsA 1 μM	63±4	5±1	3±1	21±3 ^a
CsA 1 μM+DEVD 50 μM	76±4	4±1	3±1	15±2 ^b
CsA 2.5 μM	62±4	3±1	2±1	36±4 ^a
CsA 5 μM	44±3	2±1	1±1	55±3 ^a
CsA 10 μM	20±4	1±1	2±1	78±3 ^a
CsA 10 μM+DEVD 50 μM	35±4	2±1	3±1	60±3 ^b
FK506 9 μM	83±5	4±1	4±1	11±3
아스코마이신 200nM	85±3	2±1	4±1	10±3

a: 대조군(0 μM의 CsA)과 비교했을 때, P<0.05를 유의한 값

<157> 상기 표 1로부터 유식세포측정에 의한 DNA 분석을 통해 CsA는 용량에 비례하여 세포소멸을 증가시키지만 FK506이나 아스코마이신은 그렇지 못하며, DEVD는 세포소멸을 완전히 차단하지 못함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 카스파제 3 활성화가 CsA-유도-세포소멸의 유일한 매개체가 아님을 시사한다.

<158> 실시예 5

<159> CypA의 항산화 작용

<160> CsA에 의한 CypA의 PPIase 활성 억제가 약제에 의해 유도된 분화 차단과 관련이 있는가의 문제와 CypA의 과발현을 통해 CsA-유도 독성이 완화될 수 있도록 CypA 단백질 자체가 ROS 청소 효과를 제공할 수 있는 가의 문제를 규명하고자, 먼저 CypA 유전자 전달 감염 세포를 선발하였다.

<161> 야생형 CypA 유전자가 전달 감염된 세포 CypA/wt의 제조

<162> 하기의 프라이머를 사용하여 RT-PCR을 수행하는 것에 의해 쥐 뇌의 야생형 CypA cDNA 단편을 증폭하였다:

<163> 5'-GCAAGCTTACCATGGTCAACCCCACC-3'(포워드 프라이머, HindIII 부위[밀줄] 및 kozak 서열 포함)

<164> 5'-GCGGATCCGAGTTGTCCACAGTCGGA-3'(리버스 프라이머, BamHI 부위[밀줄] 포함).

<165> 증폭된 야생형 CypA cDNA 단편을 정지 코돈을 포함하는 c-myc tag 단편들과 함께 pcDNA3.0 포유동물 발현벡터(Invitrogen, CA, USA)내로 클론시킨 다음, 이 발현벡터를 가지고 제조업체의 지침서에 따라 리포펙틴을 이용하여 H9c2 심근모세포에 유전자 전달 감염시킨 후, 한달 동안 G418(200 μ g/ml)을 사용하여 야생형 CypA 유전자가 전달 감염된 세포 CypA/wt를 선발하였다.

<166> CypA-PPIase 활성 돌연변이 세포 CypA/R55A의 제조

<167> 하기의 올리고뉴클레오타이드중 하나를 돌연변이 유발성(mutagenic) 프라이머(프라이머중 불합치는 밀줄로 표시)로 사용하여 PCR을 실시하여 55번 위치에서 아르기닌 잔기가 알라닌 잔기로 치환된 이중가닥 PCR 산물을 얻고, 이 산물을 다른 PCR 반응에서 메가프라이머(megaprimer)로 사용하여 증폭시켜 55번 위치에서 아르기닌 잔기가 알라닌 잔기로 치환된 전체 길이의 돌연변이 cDNA를 제조하였다:

<168> 5'-TCCTTTCACGCGATTATTCCA-3' 및 5'-TGGAATAATCGCGTGAAAGGA-3'.

<169> 상기 증폭된 돌연변이 cDNA 단편을 정지 코돈을 포함하는 c-myc tag 단편들과 함께 pcDNA3.0 포유동물 발현벡터(Invitrogen, CA, USA)내로 클론시킨 다음, 이 발현벡터를 가지고 제조업체의 지침서에 따라 리포펙틴을 이용하여 H9c2 심근모세포에 유전자 전달 감염시킨 후, 한달 동안 G418(200 μ g/ml)을 사용하여 돌연변이 CypA 유전자가 전달 감염 된 세포 CypA/R55A를 선발하였다.

<170> CypA-PPIase 활성 돌연변이 세포 CypA/R55A의 제조

<171> 하기의 올리고뉴클레오타이드중 하나를 돌연변이 유발성(mutagenic) 프라이머(프라이머중 불합치는 밑줄로 표시)로 사용하여 PCR을 실시하여 121번 위치에서 트립토판 잔기가 페닐알라닌 잔기로 치환된 이중가닥 PCR 산물을 얻고, 이 산물을 다른 PCR 반응에서 메가프라이머(megaprimer)로 사용하여 증폭시켜 121번 위치에서 트립토판 잔기가 페닐알라닌 잔기로 치환된 전체 길이의 돌연변이 cDNA를 제조하였다:

<172> 5'-AAGACTGAGTTCTGGATGGC-3' 및 5'-GCCATCCAGGAACTCAGTCTT-3'

<173> 상기 증폭된 돌연변이 cDNA 단편을 정지 코돈을 포함하는 c-myc tag 단편들과 함께 pcDNA3.0 포유동물 발현벡터(Invitrogen, CA, USA)내로 클론시킨 다음, 이 발현벡터를 가지고 제조업체의 지침서에 따라 리포펙틴을 이용하여 H9c2 심근모세포에 유전자 전달 감염시킨 후, 한달 동안 G418(200 μ g/ml)을 사용하여 돌연변이 CypA 유전자가 전달 감염 된 세포 CypA/W121F를 선발하였다.

<174> 5-1. 웨스턴 블롯 분석에 의한 CypA 발현 측정

<175> 상기와 같이 제조된 세포 CypA/wt, CypA/W121F 및 CypA/R55A에서 CypA의 발현수준을 c-myc에 특이적인 항체 및 CypA에 특이적인 항체를 사용하여 상기 실시에 2-1과 동일한 방법에 의해 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 그 결과를 도 7a에 나타내었다. 도 7a에서 상단 부분은 면역블롯(immunoblot)이고, 하단 부분은 Bio-Rad 영상 텐시토미터를 사용하여 정량화한 결과로서, CsA 처리된 시료에서 c-myc 및 CypA 발현양을 대조군과 비교하였을 때의 배수에 대한 평균±표준편차 값이다.

<176> 도 7a로부터 CypA/wt 또는 CypA/R55A의 이소성 발현은 CypA의 염색체내 유전자에서 기인하는 기초 발현과 비슷하였고 CypA/W121F의 발현 수준은 2배 크다는 것을 알 수 있다.

<177> 5-2. 배가시간(doubling time) 측정

<178> CypA가 세포의 증식에 영향을 미치는지 확인하고자 상기와 같이 제조된 세포 CypA/wt, CypA/W121F 및 CypA/R55A을 트립판 블루(trypan blue)로 염색한 후에 매일 세포를 계수하여 배가 시간을 측정하였다. 이 결과는 도 7b에 나타나 있다.

<179> 도 7b로부터 다양한 CypA 단백질의 과발현은 세포의 증식에 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있다. 이로부터 CypA는 증식과정에서 필수적인 기능을 가지지 않는다는 것을 알 수 있다.

<180> 5-3. CypA 과발현이 CsA와 함께 또는 CsA 없이 분화가 유도될 때 ROS 생성에 영향을 미치는지 여부 조사

<181> CypA 과발현이 CsA와 함께 또는 CsA 없이 분화가 유도될 때 ROS 생성에 영향을 미치는지 여부를 다음과 같은 방법으로 조사하였다. CsA를 함유하지 않는 DM 및 CsA $10 \mu M$ 을 함유하는 DM에서 CypA/wt, CypA/W121F 및 CypA/R55A를 각각 배양한 후, 각각의 유전자 전달 감염 세포를 $37^\circ C$ 의 온도하에 $10 \mu M$ 의 DCF에서 배양하였다. 그 다음, PBS로 1회 세척한 후, $800ml$ PBS에 다시 부유시키고, FACS 분석에 의해 ROS 함량을 측정하였다. 그 결과는 도 7c에 나타나 있다.

<182> 도 7c로부터 CypA/wt는 CsA를 함유하지 않는 DM 또는 CsA를 함유하는 DM에서 ROS 수치를 감소시켰다는 것을 알 수 있다. 또한, CypA/W121F는 CypA/wt보다 더 많은 ROS를 제거하였는데, 이는 ROS 청소능이 가용 CypA 단백질의 수준과 직접적으로 연관이 있음을 시사한다(상기 실시예 5-1 참조). 반면에 CypA/R55A는 ROS 생성을 유의하게 증가시켰는데, 이는 PPIase 활성이 ROS 청소능에 관여된다는 것을 나타낸다.

<183> 5-4. 세포의 CsA 및 H_2O_2 노출이 세포소멸로부터 세포의 보호에 미치는 효과

<184> CypA/wt, CypA/W121F 및 CypA/R55A를 DM에서 72시간 동안 $10 \mu M$ 의 CsA에 노출시켰다. 또한, 각각의 세포를 DMEM/F-12에서 12시간 동안 $300 \mu M$ 의 H_2O_2 에 노출시켰다. 그 다음, 세포의 형태학적 변화를 관찰하여 그 결과를 도 7d에 나타내었다. 또한, CsA 및 H_2O_2 에 노출한 후의 세포수를 측정하여 세포 생존율을 계산였다. 이 결과는 도 7e에

나타나 있다. 이때, 세포 생존율은 CsA 및 H₂O₂에 노출한 후의 세포 수를 초기 세포 수로 나눈 값이다.

<185> 도 7d 및 7e로부터 CypA/wt와 CypA/W121F는 CsA 또는 H₂O₂에 의해 유도된 세포소멸로부터는 세포를 보호하지만 분화차단으로부터는 세포를 보호하지 않으며, CypA/R55A는 ROS에 의한 세포소멸을 증가시킨다는 것을 알 수 있다.

<186> 5-5. Bax의 발현양 비교

<187> 상기 5-4에서와 동일한 방법으로 유전자 전달 감염 세포 CypA/wt, CypA/W121F 및 CypA/R55A를 CsA 및 H₂O₂에 노출시킨 후, CsA 또는 H₂O₂에 의해 유도된 Bax 발현 양을 웨스턴 블로트으로 분석하였다. 이 결과는 도 7f에 나타나 있다. 도 7f에서 하단 부분의 막대그래프는 유전자 전달 감염 세포의 Bax 발현양을 CsA 처리된 MOCK 유전자 전달 감염 세포의 Bax 발현양과 비교한 것이다.

<188> 도 7f로부터 유전자 전달 감염 세포를 CsA에 노출시킨 경우, CypA/wt와 CypA/W121F는 Bax 발현을 억제하였고, CypA/R55A는 발현을 증가시킨다는 것을 알 수 있다. 또한, 유전자 전달 감염 세포를 H₂O₂로 처리하였을 때에도 같은 결과를 보였다.

<189> 실시예 6

<190> 근육분화에서 CypA-PPIase 활성의 역할

<191> 6-1. 근육분화의 형태적 변화 관찰

<192> 근육분화에서 CypA의 역할, 즉 PPIase의 영향을 알아보기 위해 먼저 세 가지 CypA-유전자 전달 감염 세포 CypA/wt, CypA/W121F 및 CypA/R55A를 DM에서 배양하면서 근육분화가 완전하게 이루어지는데 소요되는 시간을 측정하고, 완전 분화되었을 때의 형태학적 변화를 관찰하였다. 그 결과는 도 8a에 나타나 있다.

<193> 도 8a로부터 CypA/wt 및 CypA/W121F 세포들은 DM에서 근육분화를 보였지만 CypA/R55A 세포는 아무런 분화의 징후를 보이지 않는다는 것을 알 수 있다. 따라서, PPIase 활성은 근육분화에 필수적이라는 것을 추정할 수 있다.

<194> 근육분화에 소요되는 시간은 대조군[pcDNA3.0 벡터 전달 감염된 H9c2 심근모세포(MOCK)]에서는 완전한 분화에 4~5일이 소요되었고, CypA/wt 세포에서는 8~9일, CypA/W121F 세포에서는 14~15일이 각각 소요되었다. 이로부터, CypA 용량에 따라 근육의 분화가 지연된다는 것을 알 수 있다.

<195> 6-2. 근육분화에서 항산화제의 영향

<196> 0.4mM의 DFOM, 2,000 unit/ml의 카탈라제 및 10mM의 트리온(Trion, 4,5-dihydroxy-1,3-benzene-disulfonic acid)을 함유하는 DM배지에서 5일 동안 배양하여 H9c2 근모세포의 분화를 유도한 후, 형태학적 변화를 관찰하였다. 이 결과는 도 8b에 나타나 있다. 이때, 대조군은 항생제를 함유하지 않는 배지에서 근모세포의 분화를 유도한 것이다.

<197> 도 8b로부터 DFOM, 카탈라제 및 트리온은 근육 분화를 차단한다는 것을 알 수 있었다. 이런 결과들은 ROS가 분화과정을 시작시키는 역할을 함을 나타내며, CypA/wt 및

CypA/W121F 세포에서와 같이 ROS를 감소시킴으로써 분화를 지연시킬 수 있다는 것을 의미한다.

<198> 실시예 7

<199> CsA에 사전 노출된 근모세포의 획득내성 및 가역성

<200> 7-1. CsA의 CypA 발현유도

<201> CsA가 CypA 발현을 유도할 수 있는지 조사하였다. H9c2 근모세포를 DM에서 48시간 동안 0 내지 $10 \mu M$ 의 CsA로 처리한 후, CypA에 특이적인 항체 및 β -액틴에 특이적인 항체를 사용한 웨스턴 블로트 분석으로 CypA의 발현 수준을 측정하였다. 그 결과는 도 9a에 나타나 있다. 도 9a에서 하단 부분의 막대 그래프는 CsA 처리된 세포에서의 발현 수준을 대조군으로 표준화한 것이다.

<202> 도 9a로부터 CsA $10 \mu M$ 에서 CypA 단백질의 발현이 약간 감소하나 전반적으로 CsA의 농도가 증가함에 따라(1 내지 $5 \mu M$ 의 농도 범위에서) CypA 단백질의 발현이 비례적으로 증가하였음을 알 수 있다.

<203> 7-2. 근모세포의 내성 및 가역성 획득

<204> 완전한 분화차단과 55%의 세포소멸을 일으키는 농도인 $5 \mu M$ 의 CsA를 첨가한 DM에 사전 노출시킨 H9c2 근모세포를 PBS로 세척한 다음, PM 또는 DM에서 각각 48시간 및 72

시간 동안 다시 배양하였을 때 세포증식 및 분화가 가역적인지를 확인하기 위하여 형태학적 변화를 관찰하고, 그 결과를 도 9b의 상단 부분에 나타내었다.

<205> 또한, $5\text{ }\mu\text{M}$ 의 CsA로 처리한 DM에 사전 노출시킨 H9c2 근모세포를 PBS로 세척한 다음, 48시간 동안 PM에서 배양하고, 다시 $10\text{ }\mu\text{M}$ 의 CsA를 첨가한 PM에서 48시간 동안 재노출시키거나, $10\text{ }\mu\text{M}$ 의 CsA를 첨가한 DM에서 72시간 동안 재노출시킨 다음, 그 형태학적 변화를 관찰하였다. 그 결과는 도 9b의 하단 부분에 나타나 있다.

<206> 도 9b는 사전 노출시킨 근모세포가 증식 및 분화가 가능함을 보여준다. 이는 $5\text{ }\mu\text{M}$ 의 CsA를 첨가한 DM의 스트레스에서 생존하여 회복되었음을 나타낸다. 더구나, 사전 노출된 세포는 잇따른 CsA 노출에 내성을 가지게 되어 10mM 의 CsA에서도 CsA를 포함하지 않은 대조군(도 8B의 분화 대조군)의 근모세포와 같은 정도로 증식 및 분화할 수 있었다는 것을 알 수 있었다. 이러한 사실은 사전 노출된 근모세포는 더 높은 농도의 CsA에 다시 노출되어도 분화과정의 지연이 없었으며, 따라서, CypA를 비롯한 스트레스 단백질의 유도가 획득내성에 기여할 수 있음을 가리킨다.

【발명의 효과】

<207> 본 발명에 따라 PPIase 활성을 갖는 사이클로필린 단백질은 항산화제로서 유용하며, 이식 세포에서 PPIase 활성을 갖는 사이클로필린 단백질의 과발현을 유도하기 위한 본 발명의 조성을 및 본 발명에 따라 PPIase 활성을 갖는 사이클로필린 단백질의 과발현이 유도된 이식 세포는 이식 성공률을 높이는데 효과적이다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

PPIase 활성을 갖는 사이클로필린 단백질을 포함함을 특징으로 하는 항산화제.

【청구항 2】

이식 세포에서 면역억제제 사이클로스포린 A 또는 이의 유사체에 의해 발생되는 독성을 감소시키기에 유효한 양의 PPIase 활성을 갖는 사이클로필린 단백질을 발현하는 재조합 발현 벡터를 포함함을 특징으로 하여, 이식 세포에서 상기 사이클로필린의 과발현을 유도하여 사이클로스포린 A 또는 이의 유사체에 의해 발생되는 독성을 방지하는 약제학적 조성물.

【청구항 3】

제2항에 있어서, 이식 세포가 근모세포인 조성물.

【청구항 4】

PPIase 활성을 갖는 사이클로필린 단백질의 과발현이 유도되어 사이클로스포린 A 또는 이의 유사체에 대해 내성을 갖는 이식 세포.

【청구항 5】

제4항에 있어서, 이식 세포가 근모세포인 이식 세포.

【청구항 6】

PPIase 활성을 갖는 사이클로필린 단백질을 코딩하는 유전자를 작동적으로 연결되도록 벡터에 도입하여 재조합 발현 벡터를 제조하고, 재조합 발현 벡터를 이식 세포에

감염시켜 배양하고, 배양물로부터 PPIase 활성을 갖는 사이클로필린이 과발현된 세포를 분리함을 포함함을 특징으로 하여, 사이클로스포린 A 또는 이의 유사체에 대해 내성을 갖는 이식 세포를 제조하는 방법.

【청구항 7】

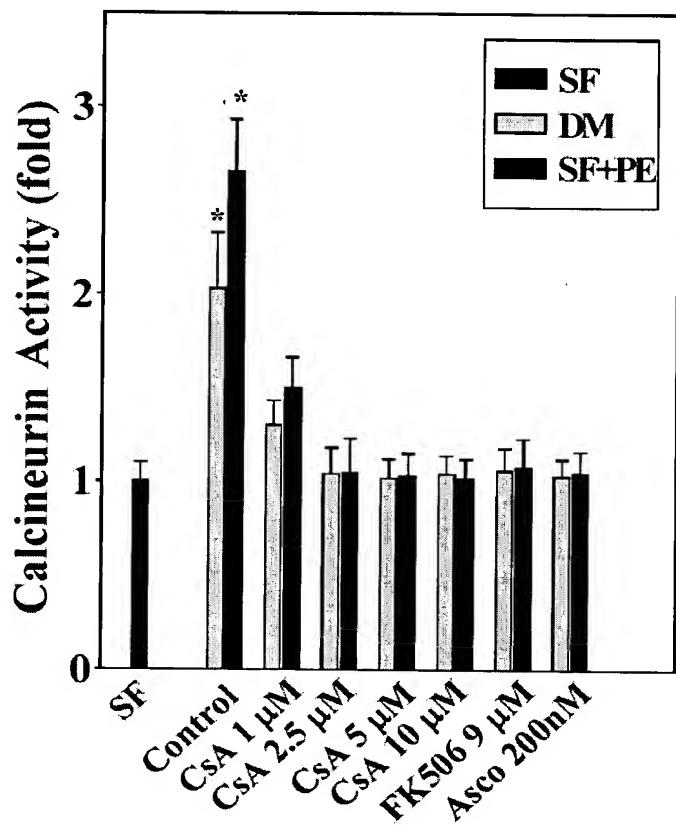
이식 세포를 사이클로스포린 A 또는 이의 유사체로 처리하여 배양하고, 배양물로부터 생존 세포를 회수함을 특징으로 하여, 사이클로스포린 A 또는 이의 유사체에 대해 내성을 갖는 이식 세포를 제조하는 방법.

【청구항 8】

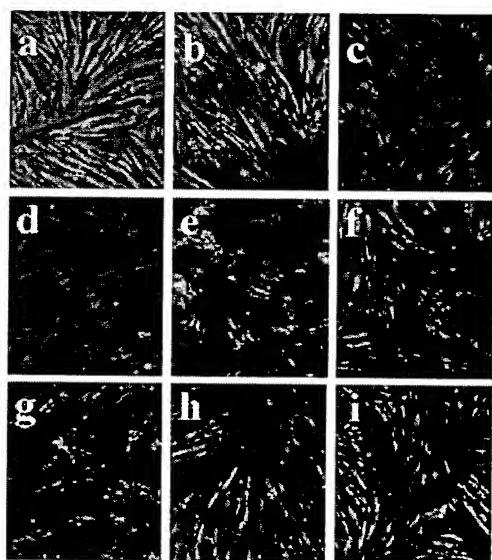
제6항 또는 제7항에 있어서, 이식 세포가 근모세포인 이식 세포.

【도면】

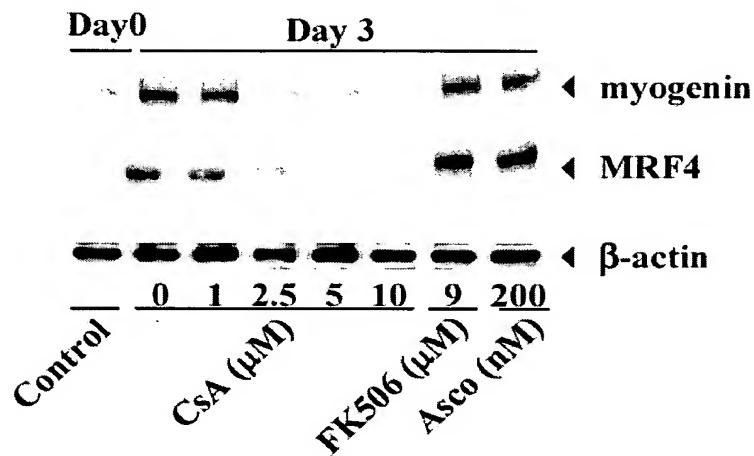
【도 1】



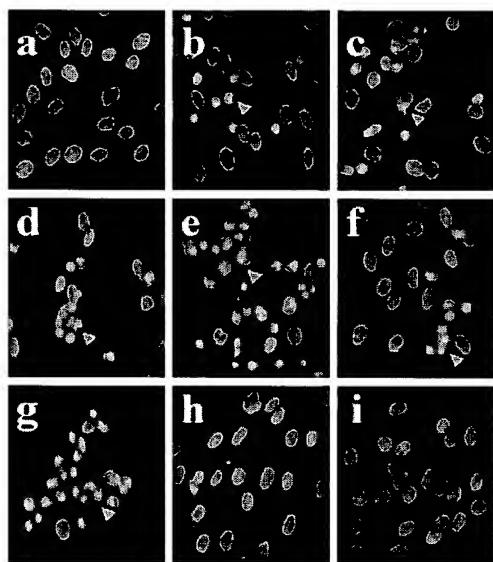
【도 2a】



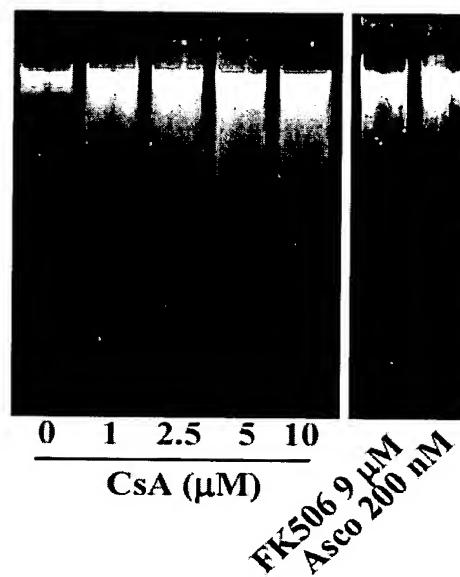
【도 2b】



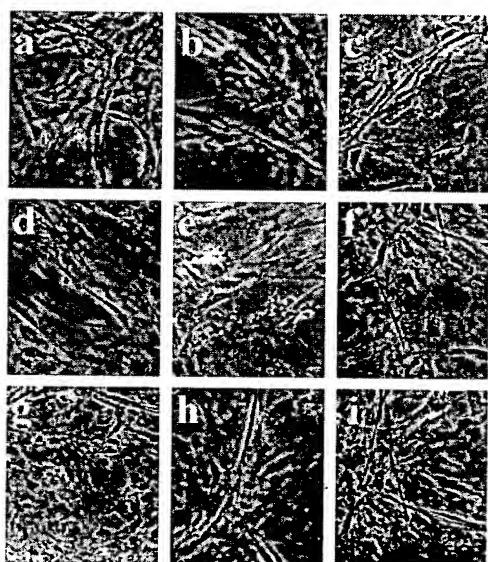
【도 2c】



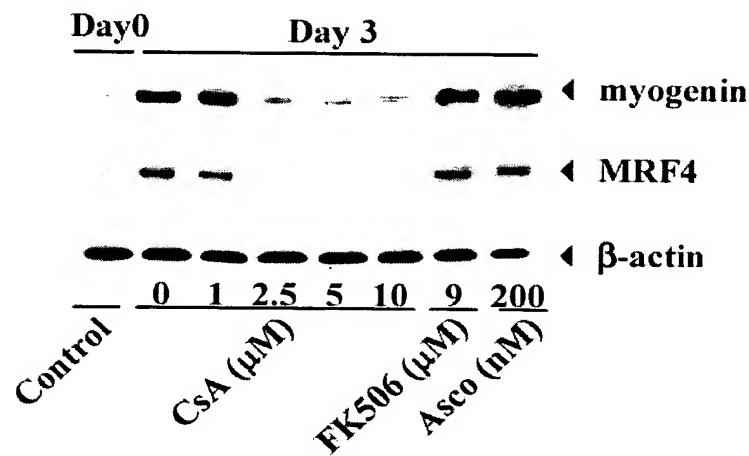
【도 2d】



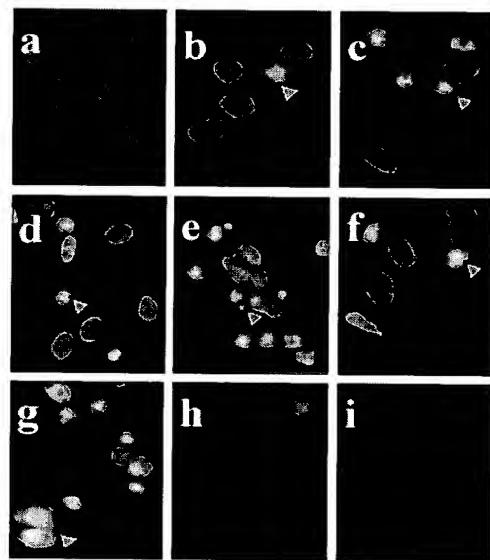
【도 3a】



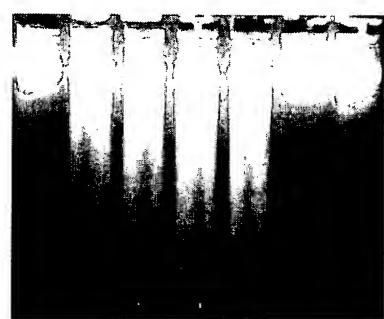
【도 3b】



【도 3c】

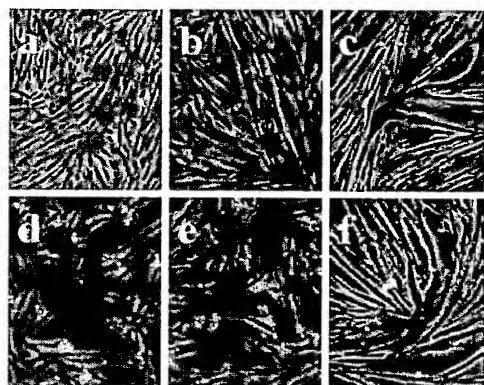


【도 3d】

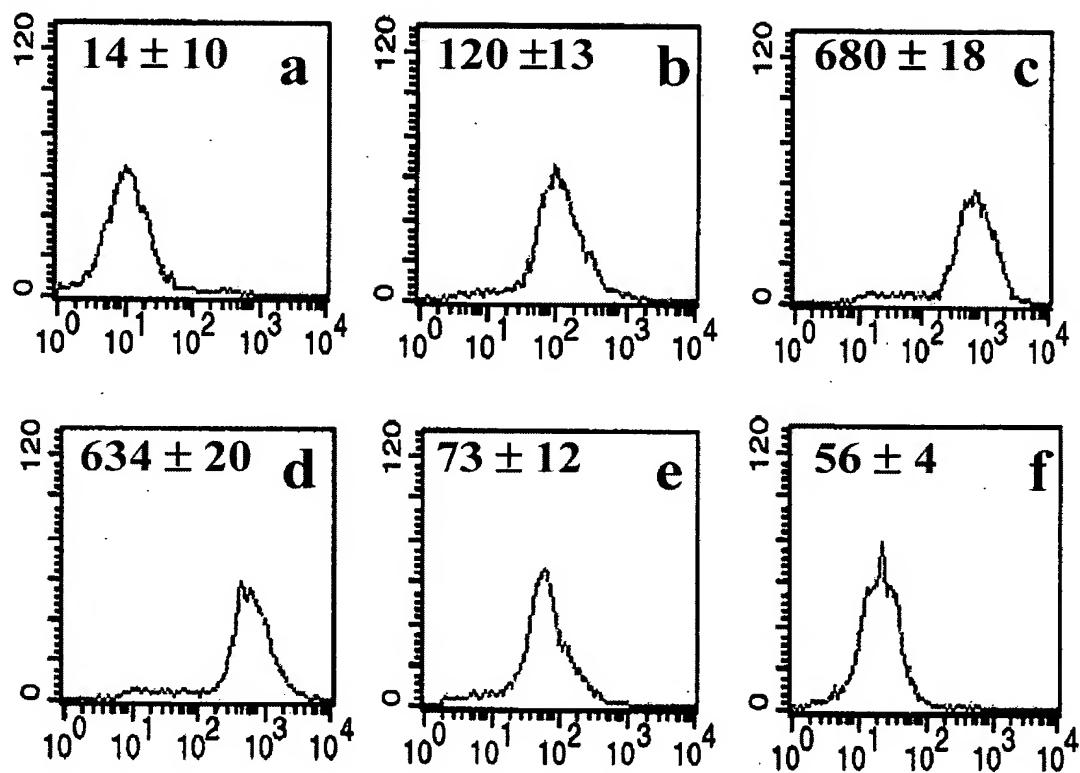


0 1 2.5 5 10
CsA (μ M) FK506 9 μ M
Asco 200 nM

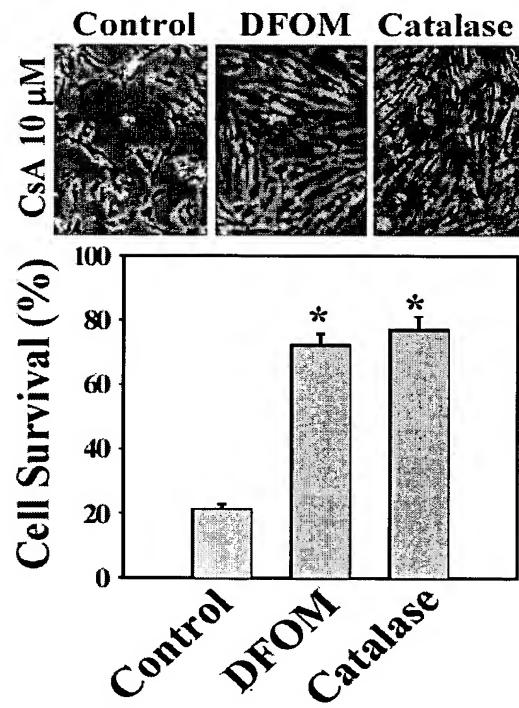
【도 4】



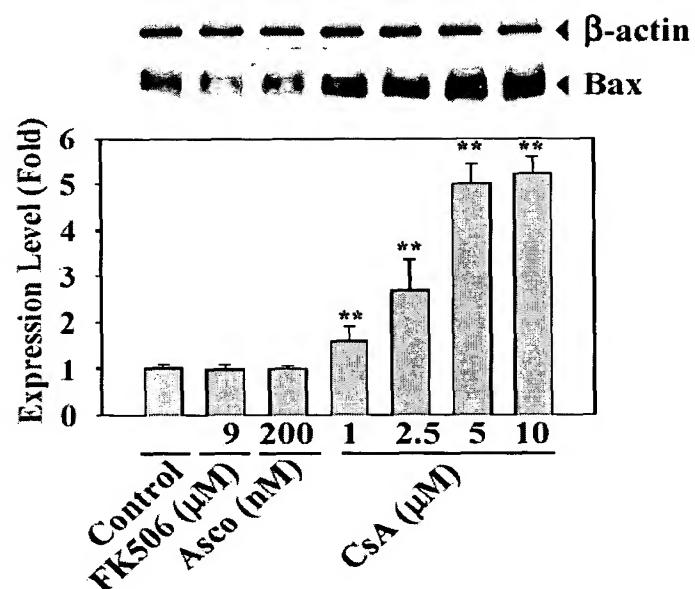
【도 5a】



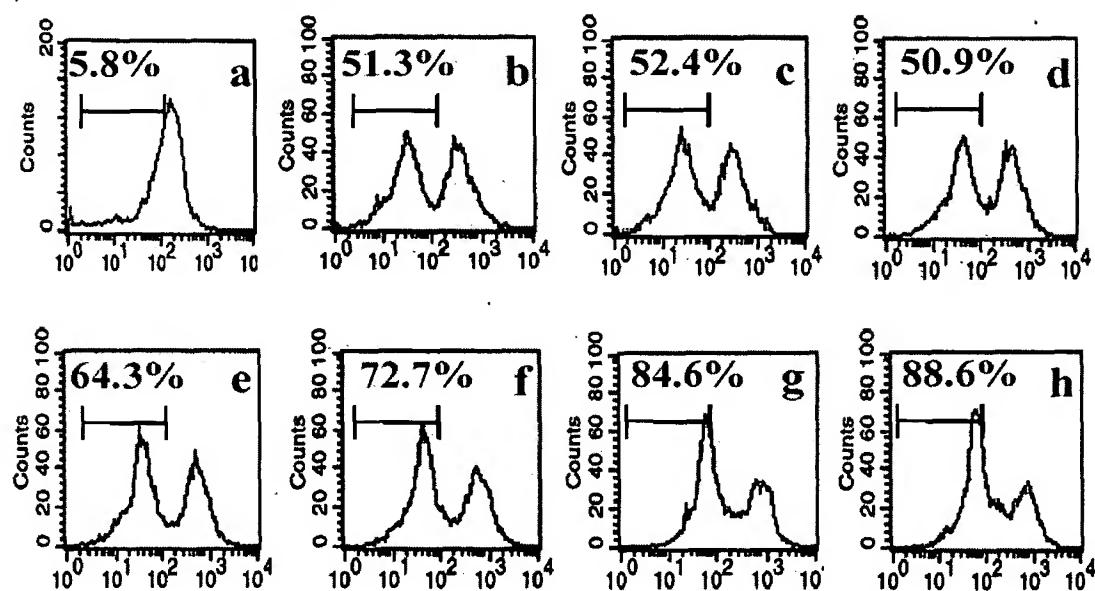
【도 5b】



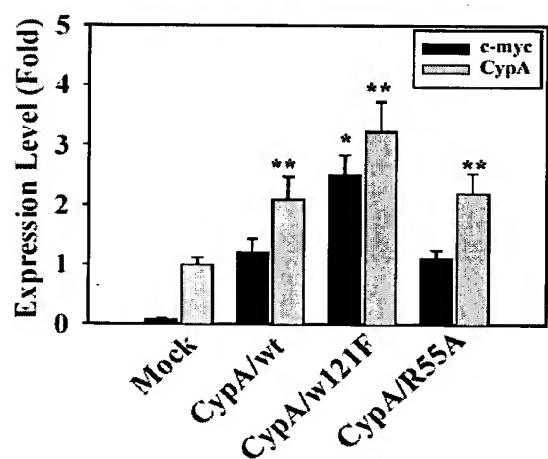
【도 6a】



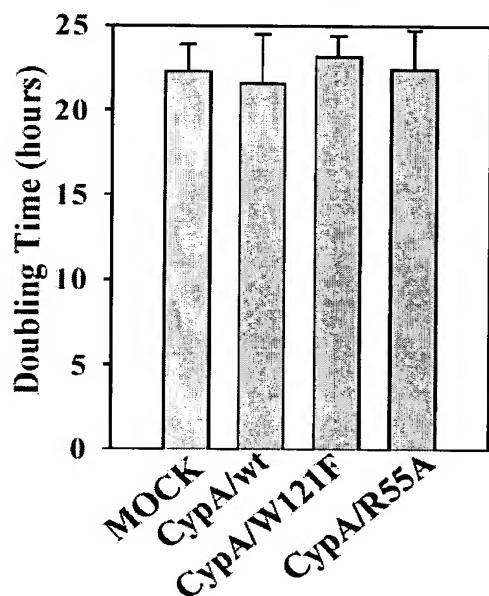
【도 6b】



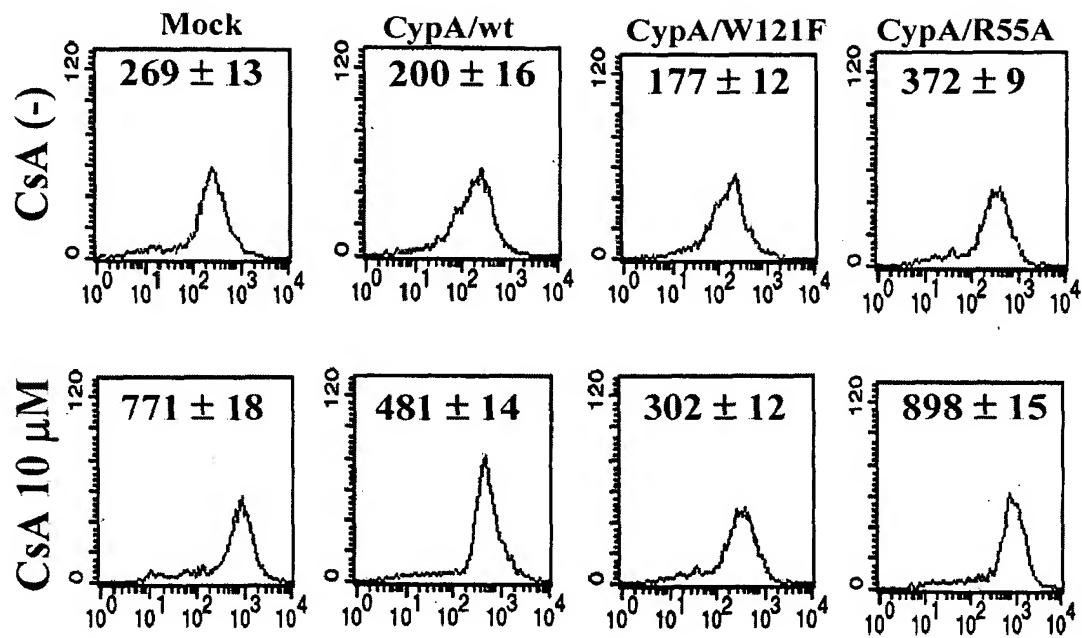
【도 7a】



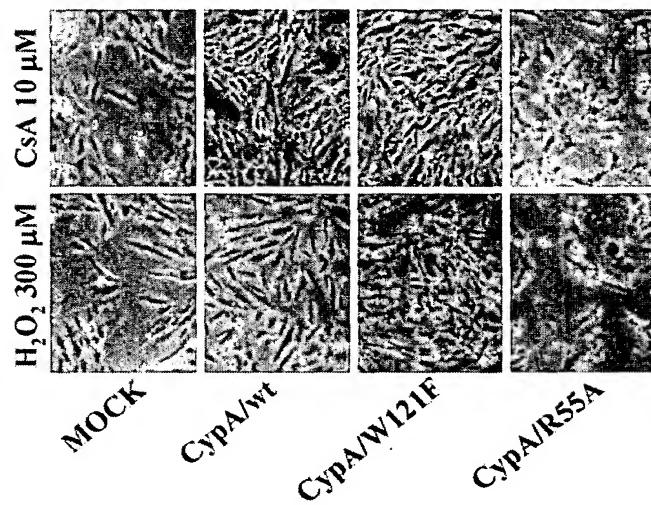
【도 7b】



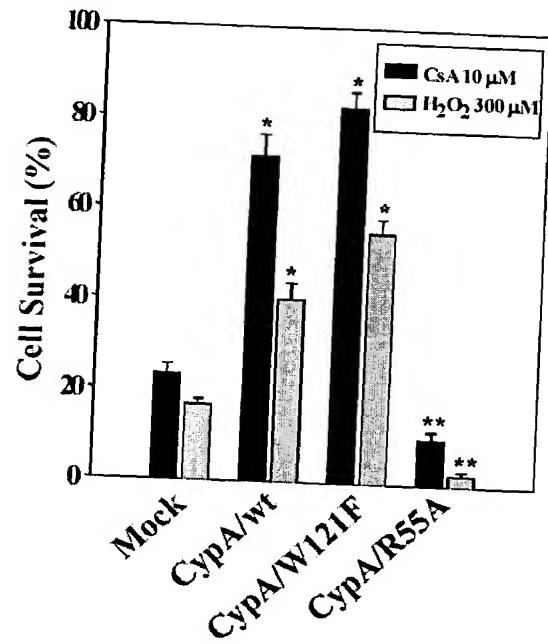
【도 7c】



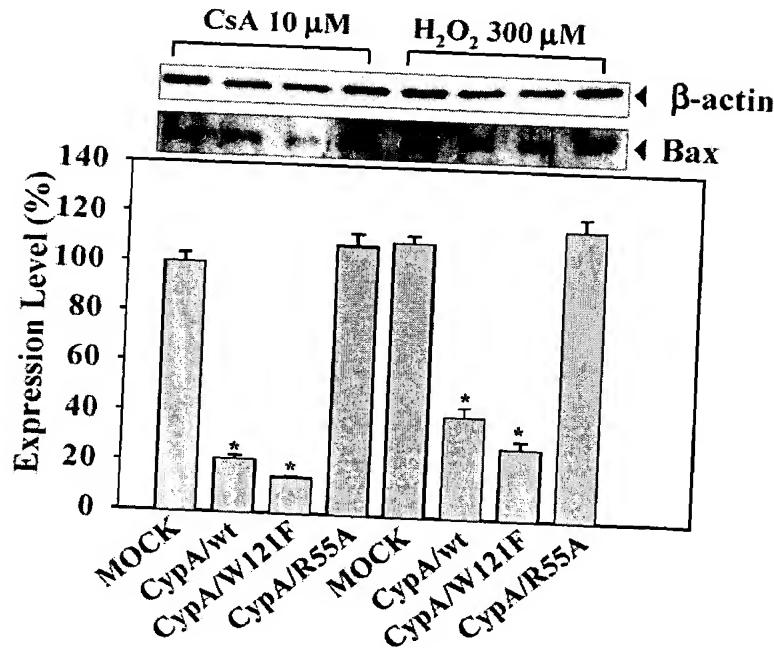
【도 7d】



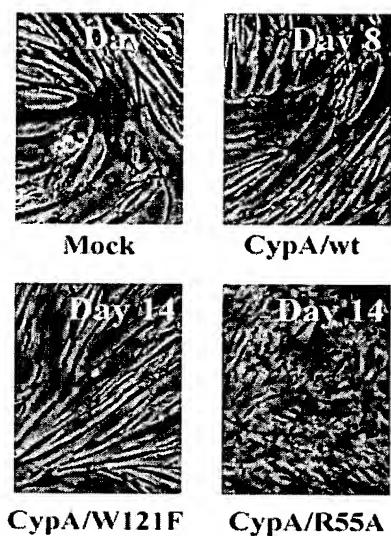
【도 7e】



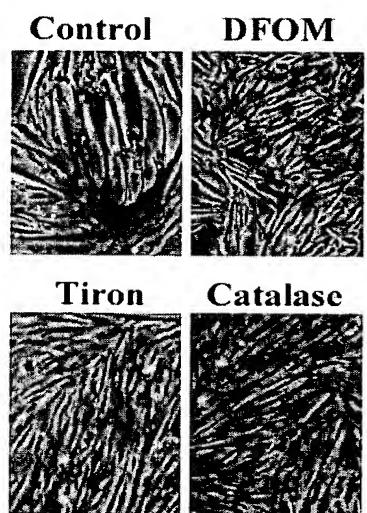
【도 7f】



【도 8a】



【도 8b】

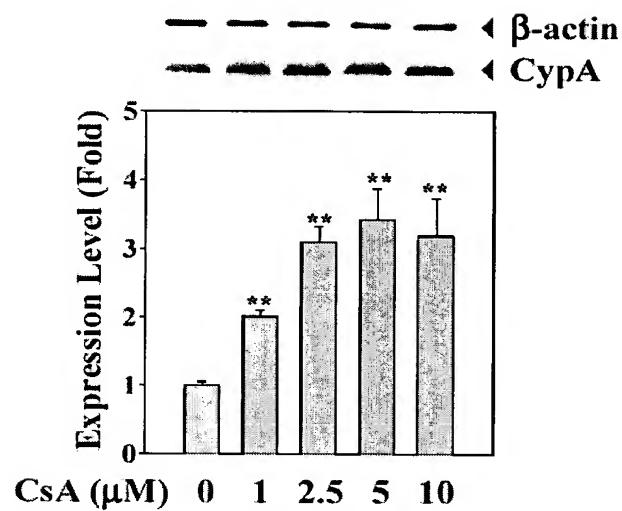




1020020069822

출력 일자: 2003/7/19

【도 9a】



【도 9b】

